

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/057881 A1

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/09, C07K 1/00, 16/36, C12P 21/08, A61K 39/395**
- (21) 国際出願番号: **PCT/JP02/13804**
- (22) 国際出願日: **2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002)**
- (25) 国際出願の言語: **日本語**
- (26) 国際公開の言語: **日本語**
- (30) 優先権データ:
特願 2001-400895
2001 年 12 月 28 日 (28.12.2001) **JP**
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): **中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).**
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): **周郷 泉 (SUGO, Izumi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1-1 3 5 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 友納 喜久男 (TOMONOU, Kikuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市 駒門 1-1 3 5 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).**
- (74) 代理人: **清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).**
- (81) 指定国 (国内): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
- (84) 指定国 (広域): **ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**
- 添付公開書類:
— **国際調査報告書**
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。**

(54) Title: **METHOD OF STABILIZING PROTEIN**

(54) 発明の名称: **タンパク質安定化方法**

(57) Abstract: **It is found out that deamidation of an antibody can be inhibited without affecting the activity of the antibody by substituting glycine adjacent to asparagine by another amino acid.**

(57) 要約:

本発明者らは、アスパラギンに隣接するグリシンを他のアミノ酸に置換すれば抗体の活性に影響を与えずに、抗体の脱アミド化を抑制しうることを見出した。



WO 03/057881 A1

明細書

タンパク質安定化方法

技術分野

本発明はタンパク質の安定性を改良する方法に関する。具体的には、タンパク質中の脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸で置換することを特徴とするタンパク質の安定化方法に関する。

背景技術

タンパク質の安定性が低下する原因の一つとして、タンパク質に含まれるアスパラギン等のアミノ酸が時間の経過と共に徐々に脱アミド化されることが挙げられる。タンパク質の中でも、特に抗体を医学的製剤として様々な疾患に対して用いる場合には、長時間安定であることが必要とされるが、実際には時間の経過と共に抗体の活性は低下していく。活性低下の原因は様々であるが、この場合も原因の一つとして抗体に含まれるアスパラギン等のアミノ酸が脱アミド化されることが挙げられる。

したがって、アスパラギンの脱アミド化を抑制すれば、タンパク質を安定化できることから、アスパラギンの脱アミド化を抑制する研究が行われている。アスパラギンの脱アミド化を防ぐには、部位特異的変異によってアスパラギンを他のアミノ酸に置換する方法が最も確実な方法として考えられるが、該置換がタンパク質の活性へ影響を及ぼす可能性がある。例えば、アスパラギンが抗体の相補性決定領域 (complementary determining region ; CDR) に存在する場合には、該置換が抗体の結合活性に影響を与えてしまうことが報告されている (Presta L, et al: Thromb Haemost 85:379-389, 2001)。また、内因性血液凝固反応において組織因子 (tissue factor ; TF) を介した第 X 因子の活性化を阻害することに

- 2 -

より、外因性血液凝固反応を抑制せずに血栓形成を抑制することが期待されている抗ヒト TF 抗体が知られているが（国際公開公報第 99/51743 号）、製剤処方されておらず、抗体が不安定化するような条件下では、その活性も時間の経過と共に低下し、その要因として抗ヒト TF 抗体の脱アミド化が推測されている。

そこで、抗体の活性に影響を与えずにアスパラギンの脱アミド化を抑制する方法が望まれていた。

発明の開示

タンパク質の活性低下は、医学的・薬学的見地から非常に重要な問題である。特に抗体に関しては、医学的製剤として用いることのできる長時間安定な抗体が、臨床的に必要とされている。特に抗体の活性低下の原因の一つである、抗体に含まれるアスパラギン等のアミノ酸の経時的脱アミド化、主に、脱アミド化されやすい Asn-Gly 配列中のアスパラギンの脱アミド化を抑制することが、抗体を安定化するために求められる。

従来、タンパク質のアミノ酸改変による脱アミド化抑制方法は、製剤処方の選択肢を増やすことにより、多様な剤形・投与経路への適応を容易にし、医薬品の価値や品質等の向上を図るためには有用な技術である。そこで本発明は、タンパク質、特に抗体の活性に影響を与えずにアスパラギンの脱アミド化を抑制する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、タンパク質の活性に影響を与えずにアスパラギンの脱アミド化を抑制する手法の開発において、タンパク質の一例として医薬としての利用が期待されている抗ヒト TF 抗体に着目して鋭意研究を行った。まず、抗ヒト TF 抗体の CDR に存在し、脱アミド化する可能性のあるアスパラギンをアスパラギン酸に置換した変異抗ヒト TF 抗体を組換え体として発現させたところ、抗ヒト TF 抗体重鎖（H 鎖）の CDR2 領域に存在する Asn54 が脱アミド化されることにより、抗ヒト TF 抗体の TF 結合活性が著しく低下することが示唆された。抗ヒト TF 抗体

- 3 -

重鎖の CDR2 領域の Asn54 に隣接するアミノ酸は Gly55 であり、これら 2 アミノ酸は脱アミド化が容易に起きやすい Asn-Gly という一次配列をとっていることから、この Gly55 を他のアミノ酸に置換することで、Asn54 の脱アミド化を抑制できる可能性を考えた。そこで、本発明者らは、アスパラギンに隣接するグリシンを他のアミノ酸に置換した変異体を調製し、その変異体の結合活性の測定を行った。その結果、アスパラギンに隣接するグリシンを他のアミノ酸に置換しても活性は低下せず、なおかつ脱アミド化による公知の不安定化を抑制できることを見出した。

すなわち、本発明者らは、アスパラギンの置換を行う代わりに、アスパラギンに隣接するグリシンを他のアミノ酸に置換すれば、抗体の活性に影響を与えないことを見出し、本発明を完成した。

本発明は、より詳細には、

- (1) タンパク質中の脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸で置換することを特徴とするタンパク質の安定化方法、
- (2) 脱アミド化されるアミノ酸がアスパラギンである、(1) に記載のタンパク質の安定化方法、
- (3) 脱アミド化されるアミノ酸の C 末端側に隣接するアミノ酸がグリシンである、(1) に記載のタンパク質の安定化方法、
- (4) タンパク質が抗体である、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質の安定化方法、
- (5) 抗体がヒト型化抗体である、(4) に記載のタンパク質の安定化方法、
- (6) 脱アミド化されるアミノ酸が相補性決定領域 (CDR) に存在することを特徴とする、(4) または (5) に記載のタンパク質の安定化方法、
- (7) 相補性決定領域 (CDR) が CDR2 である (6) に記載のタンパク質の安定化方法、
- (8) タンパク質が抗原結合タンパク質である、(1) から (3) のいずれか

- 4 -

に記載のタンパク質の安定化方法、

(9) タンパク質が免疫グロブリンスーパーファミリーである、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質の安定化方法、

(10) タンパク質が医薬品である、(1) から (3) いずれかに記載のタンパク質安定化方法、

(11) (1) から (10) のいずれかに記載の方法により安定化されたタンパク質、

(12) 抗原結合活性がアミノ酸置換前の抗原結合活性の70%以上であることを特徴とする、(11) 記載の安定化されたタンパク質、
を提供するものである。

以下に本明細書に規定された用語の定義を示すが、これらは、本明細書中で使用される用語を理解を容易にする目的で記載されたものであり、本発明を限定する目的で用いられるべきではないことは理解されたい。

本明細書中の「タンパク質」という用語は、5 アミノ酸以上の、組換えタンパク質、天然のタンパク質、およびアミノ酸同士を人工的に結合して調製された合成ペプチドを意味する。タンパク質は、好ましくは14 残基以上、さらに好ましくは30 残基以上、さらに好ましくは50 残基以上のアミノ酸配列からなる。

本発明の安定化方法における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、抗体変異体、抗体断片（例えば、Fab、F(ab')₂ および Fv）、ならびに多特異性抗体（例えば、二特異性抗体）等が含まれる。抗体 (Ab) および免疫グロブリン (Ig) は同じ構造特性を有する糖タンパク質である。抗体が特定の抗原に対する特異的結合性を示すのに対して、免疫グロブリンには、抗体および抗原特異性を欠く他の抗体様分子が含まれる。天然の抗体および免疫グロブリンは、一般的に約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体であり、2 本の同じ軽鎖 (L 鎖) および 2 本の同じ重鎖から成る。各軽鎖は、重鎖に 1 つ

の共有ジスルフィド結合により連結されているが、重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンのアイソタイプの種類によって異なる。重鎖および軽鎖はまた、それぞれ一定間隔の鎖内ジスルフィド橋を有する。各重鎖は一つの末端に可変領域（VH）を有し、それに連結された多数の定常領域を有する。各軽鎖は一方の末端に可変領域（VL）を有し、他方の末端に定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定常領域と並んでおり、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と並んでいる。特定のアミノ酸残基が軽鎖および重鎖の可変領域のインターフェイスを形成していると考えられている（Chothia C, et al: J Mol Biol 186:651-663, 1985、Novotny J, Haber E: Proc Natl Acad Sci USA 82:4592-4596, 1985）。

脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の軽鎖は、その定常領域のアミノ酸配列に基づき、カッパ（ κ ）とラムダ（ λ ）と呼ばれる2つの明らかに異なる型に分類できる。また、「免疫グロブリン」は、重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づき、異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンには、少なくとも5つの主要なクラス、IgA、IgD、IgE、IgG および IgM が存在し、そしてさらに、これらのうちのいくつかはサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3 および IgG-4 や、IgA-1 および IgA-2 に分類することができる。異なるクラスの重鎖定常領域は、各々 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ばれる。各クラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元構造は周知である。

本明細書中の「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、天然において起こり得る少量で存在する変異体を除いては均一である抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して作用するものである。さらに、異なる抗原決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含む慣用な（ポリクローナル）抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基に向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗

- 6 -

体は、他の免疫グロブリンにより汚染されていないハイブリドーマ培養により合成される点で有利である。

「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団より得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法により製造されることを要求するものではない。例えば、本発明において用いられるモノクローナル抗体を、例えばハイブリドーマ法 (Kohler G, Milstein C: Nature 256:495-497, 1975)、または、組換え方法 (米国特許第 4,816,567 号) により製造してもよい。本発明において使用するモノクローナル抗体はまた、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい (Clackson T, et al: Nature 352:624-628, 1991、Marks J D, et al: J Mol Biol 222:581-597, 1991)。本明細書中のモノクローナル抗体には、特に、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の種、または特定の抗体クラスもしくはサブクラス由来であり、鎖の残りの部分が別の種、または別の抗体クラスもしくはサブクラス由来である「キメラ」抗体 (免疫グロブリン)、ならびに、所望の生物学的活性を有する限り、このような抗体の断片が含まれる (米国特許第 4,816,567 号、Morrison SL, et al: Proc Natl Acad Sci USA 81:6851-6855, 1984)。

「抗体変異体」という用語は、1 またはそれ以上のアミノ酸残基が改変された、抗体のアミノ酸配列バリエーションを指す。どのように改変されたアミノ酸バリエーションであっても、元となった抗体と同じ結合特異性を有すれば、本明細書中の「抗体変異体」に含まれる。このような変異体は、抗体の重鎖もしくは軽鎖の可変領域のアミノ酸配列と少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、さらに好ましくは少なくとも 85%、さらにより好ましくは少なくとも 90%、そして最も好ましくは少なくとも 95% のアミノ酸配列相同性または類似性を有するアミノ酸配列と 100% よりも少ない配列相同性、または類似性を有する。本発明の方法は、抗体およびその断片の両ポリペプチドに対して等しく適用されるので、これらの用語はときどき交代して使用される。

- 7 -

「抗体断片」という用語は全長抗体の一部のことであり、一般に抗原結合領域または可変領域を指す。例えば、抗体断片には Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ および Fv 断片が含まれる。抗体のパパイン消化により、Fab 断片と呼ばれる、各 1 つずつの抗原結合部位を有する 2 つの同じ抗原結合断片、および残りの、容易に結晶化するために「Fc」と呼ばれる断片が生じる。また、ペプシン消化により、2 つの抗原結合部位を有し、抗原を交差結合し得る $F(ab')_2$ 断片、および残りの別な断片 (pFc' と呼ばれる) が得られる。その他の断片としては、diabody (diabodies)、線状抗体、一本鎖抗体分子および抗体断片より形成された多特異性抗体が含まれる。本明細書中、抗体の「機能性断片」とは Fv、F(ab) および $F(ab')_2$ 断片を指す。

ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は 1 つの重鎖および軽鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである (V_H - V_L ダイマー)。各可変領域の 3 つの CDR が相互作用し、 V_H - V_L ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6 つの CDR が抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1 つの可変領域 (または、抗原に特異的な 3 つの CDR のみを含む Fv の半分) であっても、全結合部位よりも親和性は低い、抗原を認識し、結合する能力を有する。

また、Fab 断片 (F(ab) と呼ばれる) はさらに、軽鎖の定常領域および重鎖の定常領域 (CH1) を含む。Fab' 断片は、抗体のヒンジ領域からの 1 またはそれ以上のシステインを含む重鎖 CH1 領域のカルボキシ末端由来の数個の残基を付加的に有する点で Fab 断片と異なっている。Fab'-SH とは、定常領域の 1 またはそれ以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有する Fab' を示すものである。F(ab') 断片は、 $F(ab')_2$ ペプシン消化物のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。

「diabody (diabodies)」という用語は、2 つの抗原結合部位を有する小さな

- 8 -

抗体断片を指し、該断片は、同じポリペプチド鎖中で軽鎖可変領域 (VL) に連結された重鎖可変領域 (VH)、VH-VL を含む。同じ鎖中で 2 つの領域間を結合できないくらいに短いリンカーを用いると、2 つの領域はもう一方の鎖の定常領域とペアを形成し、2 つの抗原結合部位が創り出される。Diabody については、例えば欧州特許第 404,097 号、国際公開公報第 93/11161 号および Holliger P, et al (Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448, 1993) により詳細に記載されている。

一本鎖抗体 (以下、一本鎖 Fv もしくは sFv と呼ぶ) または sFv 抗体断片には、抗体の VH および VL 領域が含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、Fv ポリペプチドはさらに VH および VL 領域の間にポリペプチドリッパを含んでおり、これにより sFv は、抗原結合のために必要な構造を形成することができる。sFv の総説については、Pluckthun 『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269-315, 1994) 参照。

多特異性抗体は、少なくとも 2 種類の異なる抗原に対して特異性を有する抗体である。通常、このような分子は 2 個の抗原を結合するものであるが (すなわち二重特異性抗体)、本明細書中では「多特異性抗体」は、それ以上 (例えば、3 種類の) 抗原に対して特異性を有する抗体を包含するものである。多特異性抗体は全長から成る抗体、またはそのような抗体の断片 (例えば、F(ab')₂ 二特異性抗体) であり得る。

本発明の「ヒト型化抗体」とは、遺伝子工学的に作製される抗体であって、具体的には、その超可変領域の CDR の一部または全部が非ヒト哺乳動物 (マウス、ラット、ハムスター等) のモノクローナル抗体に由来する超可変領域の CDR であり、その可変領域の枠組領域がヒト免疫グロブリン由来の可変領域の枠組領域であり、かつその定常領域がヒト免疫グロブリン由来の定常領域であることを特徴とする抗体を意味する。ここで、超可変領域の CDR とは、抗体の可変領域中の超

可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する 3 つの領域 (CDR1、CDR2、CDR3) を指す。また、可変領域の枠組領域とは、前記 3 つの CDR の前後に介在する比較的保存された 4 領域 (framework region; FR1、FR2、FR3、FR4) のことを指す。すなわち、本発明の「ヒト型化抗体」とは、非ヒト哺乳動物由来のモノクローナル抗体の超可変領域の CDR の一部または全部以外のすべての領域が、ヒト免疫グロブリンの対応領域と置換された抗体を意味する。

さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも導入された CDR または枠組構造配列のどちらにも見られない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、さらに抗体の能力を正確に至適化するために行われる。一般に、すべてのヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変領域を実質的に含む。その中で、すべて、または実質的にすべての CDR 領域は、非ヒト免疫グロブリンの CDR に対応し、全部または実質的に全部の FR はヒト免疫グロブリン可変領域のものである。最適には、ヒト化抗体はさらに、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Jones PT, et al (Nature 321:522-525, 1986)、Riechmann L, et al (Nature 332:323-327, 1988) および Presta, et al (Curr Op Struct Biol 2:593-596, 1992) 参照のこと。

抗体の可変領域における「可変」という用語は、可変領域中のある部分が抗体間で非常に異なっており、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性において使用されていることを指す。可変な部分は、軽鎖および重鎖の両可変領域中の CDR または超可変領域と呼ばれる 3 つの部分に集中している。CDR を決定するためには、少なくとも次の 2 つの方法がある：(1) 種間配列変異性に基づく手法 (すなわち、Kabat, et al: Sequence of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda) 1987) および (2) 抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づいた手法 (Chothia C, et al: Nature 342: 877-883, 1989)。可変領域の中でより高度に保存された部分は、FR と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変領域は、主として β シート構造を持ち、3 つのル

- 10 -

ープ状連結を形成し、場合によっては β シート構造の部分形成する CDR により連結された 4 つの FR を含む。各鎖中の CDR は、FR によりもう一方の鎖の CDR と非常に近接して保持され、抗体の抗原結合部位の形成に一役買っている (Kabat, et al、参照)。定常領域は、抗体の抗原への結合には直接関与していないが、抗体の抗体依存細胞毒性への参加等の種々のエフェクター機能を示す。

ヒト免疫グロブリン由来の定常領域は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgD および IgE 等のアイソタイプごとに固有のアミノ酸配列を有しているが、本発明において該ヒト型化抗体の定常領域は、いずれのアイソタイプに属する抗体の定常領域であってもよい。好ましくは、ヒト IgG の定常領域が用いられる。また、ヒト免疫グロブリン由来の可変領域の FR についても特に限定されない。

本明細書中の「抗原」には、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原（ハプテンを含む）の両方が含まれる。抗原としては、タンパク質、ポリペプチド、多糖、核酸、脂質等の物質が挙げられ、その種類は特に限定されない。抗体を調製する際の免疫原としては、場合により他の分子に結合させた可溶性抗原またはその断片を、抗体を産生するための免疫原として用いることができる。受容体等の膜貫通分子については、これらの断片（例えば、受容体の細胞外領域）を免疫原として用いることができる。また、膜貫通分子を発現する細胞を免疫原として用いてもよい。このような細胞は、天然（例えば、腫瘍細胞株）でもよく、または膜貫通分子を発現するように組換え技術により形質転換した細胞でもよい。抗体の調製には、その他の当業者に公知のいずれの形態の抗原をも使用し得る。

本明細書中でいう「抗原結合タンパク質」は、抗原との結合能を有するタンパク質のことをさす。

本明細書中でいう「免疫グロブリンスーパーファミリー」とは免疫グロブリンの定常または可変ドメインと相同性のあるドメインを一つあるいは複数個含むと

- 1 1 -

いう構造上の特徴をもつタンパク質である。免疫グロブリンスーパーファミリーには、免疫グロブリン（H鎖、L鎖）、T細胞レセプター（ α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖、 δ 鎖）、MHCクラスI分子（ α 鎖）、 β_2 ミクログロブリン、MHCクラスII分子（ α 鎖、 β 鎖）、CD3（ γ 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖）、CD4、CD8（ α 鎖、 β 鎖）、CD2、CD28、LFA-3、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1、PECAM-1、FcレセプターII、polyIgレセプター、Thy-1、NCAM、MAG (myelin-associated glycoprotein)、Po、CEA (carcinoembryonic antigen)、PDGFレセプターなどが含まれる。

本明細書中でいう「医薬品」とは、疾病や怪我などの治療や予防、体質の改善などの目的で動物に投与される物質のことをいう。

1. タンパク質の安定化のためのアミノ酸の改変

本発明は、タンパク質中の脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸で置換することを特徴とするタンパク質の安定化方法を提供する。本発明において安定化の対象となるタンパク質には、特に制限はない。好適なタンパク質の一例として抗体が挙げられる。抗体としては、医薬としての有用性の観点からヒト化抗体又はヒト抗体が好ましい。

タンパク質中の脱アミド化されるアミノ酸としては、アスパラギン以外にもグルタミンが知られている (Scotchler JW, Robinson AB: Anal Biochem 59:319-322, 1974)。5 アミノ酸からなるペプチドで比較すると、アスパラギンの半減期が6~507日であるのに対して、グルタミンの半減期は96~3409日である。すなわち、グルタミンの脱アミド化反応速度はアスパラギンに比べて非常に遅い (Bischoff R, Kolbe HVJ: J Chromatogr B 662:261-278, 1994)。抗体製剤に関しては、グルタミンの脱アミド化は検出されていない (Harris RJ, Kabakoff B, Macchi FD, Shen FJ, Kwong M, Andya JD, et al: J Chromatogr B 752:233-245, 2001)。しかし、生体内での脱アミド化反応は製剤中よりも加速されることが予想されるため (Robinson NE, Robinson AB: Proc Natl Acad Sci USA 98:1240

- 12 -

9-12413, 2001)、生体内半減期の長い抗体製剤を開発する場合には、アスパラギンに加えてグルタミンの脱アミド化を抑制することが必要となると考えられる。脱アミド化されるアミノ酸は、好ましくはアスパラギンである。

タンパク質中の脱アミド化されるアミノ酸に隣接し、置換しうるアミノ酸としては、グリシン以外のアミノ酸も考えられる (Robinson NE, Robinson AB: Proc Natl Acad Sci USA 98:4367-4372, 2001)。しかしながら、特にグリシンはアスパラギンの脱アミド化を引き起こすことが知られている。脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸は、好ましくはグリシンである。

一般に、CDRにあるアミノ酸を置換すると抗体の活性が失活するが、CDRに存在するアスパラギンに隣接するアミノ酸を他のアミノ酸で置換しても抗体の活性は維持され、安定性を改善できることが発明者らにより見出された。したがって、本発明においては、CDRのアスパラギンに隣接するアミノ酸を他のアミノ酸への置換の標的とすることが、効果的である。アスパラギンに隣接するアミノ酸としては、グリシンが置換の標的に適しており、特に脱アミド化されやすい「Asn-Gly」配列中に存在するグリシンは、最も好適な標的である。

本発明においては、タンパク質の安定性および生物学的活性を低下させない限り、上記の脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸に加えて、それ以外の1もしくは複数のアミノ酸を改変してもよい。タンパク質が抗体である場合、その生物学的活性とは、抗原と特異的に結合する活性を指す。アミノ酸の改変は、タンパク質の性質を保持させる観点から、保存的置換であることが好ましい。

タンパク質のアミノ酸の改変は、タンパク質をコードする遺伝子配列を組み換える方法で行うことができる。遺伝子の組換えには、一般的に知られている手法を用いることができる。

タンパク質が抗体である場合、そのアミノ酸の改変は、以下のように行うことができる。例えば、抗体の1または複数の超可変領域において、1または複数のアミノ酸残基が改変されたバリエーション抗体または変異体を作製することができる。

- 13 -

。それに加えて、抗体配列に変異を加えることによって抗原への抗体変異体の結合親和性が改善されるように、哺乳動物抗体の枠組構造残基に、1または複数の変異（例えば、置換）を導入することができる。改変できる枠組構造残基の例には、抗原に直接、非共有結合により結合する部分（Amit AG, et al: Science 233:747-753, 1986）、CDRの構造に作用する、および／もしくは影響する部分（Chothia C, Lesk AM: J Mol Biol 196:901-917, 1987）、ならびに／または、VL-VH相互作用に関係する部分（欧州特許第 239,400,B1 号）が含まれる。ある態様では、1または複数のこのような枠組構造残基の改変により、抗原に対する抗体の結合親和性が増幅される。

抗体変異体を製造するための有用な方法の一つに「アラニンスキャニング突然変異誘発」（Cunningham BC, Wells JA: Science 244:1081-1085, 1989、Cunningham BC, Wells JA: Proc Natl Acad Sci USA 84:6434-6437, 1991）がある。この方法によると、1もしくはそれ以上の超可変領域残基がアラニン、またはポリアラニン残基により置換され、抗原と該抗原と対応するアミノ酸との相互作用が変化する。置換に対して機能的に感受性を示した超可変領域残基は、その後、置換部位に対してさらに、または別の変異を導入することによってより詳細に区別される。よって、アミノ酸配列変異を導入する部位はあらかじめ決定されているが、変異の種類はあらかじめ決定しておく必要はない。

この方法により製造された ala 変異体を、その生物学的活性についてスクリーニングする。スキャニングする残基により与えられる所望の性質に依存して、他のアミノ酸について同様の置換を試みることもできる。また、改変するアミノ酸残基をより体系的に同定する方法もある。この方法では、第1の哺乳動物種抗原を結合するのに関与する種特異的抗体中の超可変領域残基、および第2の哺乳動物種の相同抗原の結合に関与する超可変領域残基を同定することができる。これを達成するためには、各 ala 変異体について第1および第2の哺乳動物種の抗原に対する結合を試験する種特異的抗体の超可変領域残基のアラニン検索を行い、

- 1 4 -

第 1 の哺乳動物種（例えばヒト）の抗原の結合に関与する超可変領域残基、および第 2 の哺乳動物種（例えば非ヒト）の抗原の相同体の結合に関与する部分を同定する。好ましくは、第 2 の哺乳動物種（例えば非ヒト哺乳動物）由来の抗原の結合に明らかに関与するが、第 1 の哺乳動物種（例えばヒト）由来の抗原の結合には関与しない残基は、改変のための候補となる。別の態様においては、第 1 および第 2 の哺乳動物種由来の抗原の結合に明らかに関与する残基が改変のために選択される。このような改変には、残基の欠失、または、1 もしくはそれ以上の残基を標的残基に連結させる挿入が含まれるが、通常、改変とは残基を別のアミノ酸に置換することである。

アミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当分野において公知の種々の方法により調製される。これらの方法には、次のものに限定されるわけではないが、種特異的抗体の先に調製した変異体または非変異体バージョンのオリゴヌクレオチド媒介（または部位特異的）変異、PCR 変異、およびカセット変異が含まれる。変異体の作製において好ましい方法は、部位特異的変異（Kunkel TA: Proc Natl Acad Sci USA 82:488-492, 1985 参照）等である。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は、少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 80%、さらにより好ましくは少なくとも 85%、より一層好ましくは少なくとも 90%、そして、最も好ましくは少なくとも 95% のアミノ酸配列相同性または類似性を、元となった抗体の重鎖もしくは軽鎖の可変領域のアミノ酸配列と有する。配列の相同性または類似性は、本明細書中では、配列相同性が最大の値を取るように、必要に応じて配列を整列およびギャップを導入した後の候補配列中の種特異的抗体残基と相同（すなわち、同じ残基）、または類似（すなわち、上述の一般的な側鎖特性に基づいた同じグループのアミノ酸残基）するアミノ酸残基の割合として定義される。

代わりに、抗体の重鎖および軽鎖の CDR の系統的な変異により抗体変異体を作製することもできる。このような抗体変異体を作製するための好ましい方法には

- 15 -

、ファージディスプレイ (Hawkins RE, et al: J Mol Biol 226:889-896, 1992、Lowman HB, et al: Biochemistry 30:10832-10838, 1991) を用いたアフィニティ成熟 (affinity maturation) を利用した方法が含まれる。バクテリオファージコートタンパク質融合 (Smith GP: Science 228:1315-1317, 1985、Scott J K, Smith GP: Science 249:386-390, 1990、Cwirla SE, et al: Proc Natl Acad Sci USA 87:6378-6382, 1990、Devlin JJ, et al: Science 249:404-406, 1990、Wells and Lowman による総説、Curr Opin Struct Biol 2:597, 1992、米国特許第 5,223,409 号) は、ディスプレイされたタンパク質またはペプチドの表現型を、それをコードするバクテリオファージ粒子の遺伝子型につなげるのに有用な方法として知られる。また、抗体の F(ab) 領域をファージ上にディスプレイする方法も知られる (McCafferty, et al: Nature 348:552, 1990、Barbas, et al: Proc Natl Acad Sci USA 88:7978, 1991、Garrard, et al: Biotechnology 9:1373, 1991)。一価のファージディスプレイは、タンパク質バリエーションの一群をバクテリオファージのコートタンパク質との融合体として、数個のファージ粒子についてバリエーションの 1 つのコピーのみが提示されるようにディスプレイする工程を含む (Bass, et al: Proteins 8:309, 1990)。

アフィニティ成熟、または、種々のタンパク質の結合親和性の平衡の改善は、以前より、ヒト成長ホルモン (Lowman and Wells, J Mol Biol 234:564-578, 1993、米国特許第 5,534,617 号)、および、抗体の F(ab) 領域 (Barbas, et al: Proc Natl Acad Sci USA 91:3809, 1994、Yang, et al: J Mol Biol 254:392, 1995) の例に見られるように突然変異生成、一価ファージディスプレイ、機能分析および好ましい変異の付加により行われている。配列の特定部分が異なる多くの (10⁶ 個) タンパク質バリエーションのライブラリーを、特定のタンパク質バリエーションをコードする DNA を各々含むバクテリオファージ粒子上に作製することができる。固定された抗原を用いて何サイクルかアフィニティ精製した後、個々のバクテリオファージクローンを単離し、そのディスプレイされたアミノ酸配列を DNA

- 16 -

から類推することができる。

2. ポリクローナル抗体の製造

ポリクローナル抗体は好ましくは、関連抗原およびアジュバントの複数の皮下 (sc) または腹膜内 (ip) 注射により非ヒト哺乳動物で作られる。免疫化される種に対して免疫原性のタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、仔ウシチログロブリン、または大豆トリブシンインヒビターに、例えば、マレイミドベンゾイルスルフォスクシンイミドエステル (システイン残基を介した結合)、N-ヒドロキシスクシンイミド (リシン残基を介した)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、塩化チオニル、もしくは $R^1N=C=CR$ (式中、R および R^1 は異なるアルキル基である) 等の二機能性の薬剤もしくは誘導剤を用いて関連抗原を結合させることもできる。

例えば、100 μ g もしくは 5 μ g のタンパク質もしくはコンジュゲート (それぞれ、ウサギまたはマウスについての量) を 3 倍量の Freund's 完全アジュバントと合わせ、溶液を複数回、皮内注射することにより、動物を抗原、免疫原性コンジュゲートまたは誘導体に対して免疫化する。一カ月後、動物を元の Freund's 完全アジュバント中のペプチドまたはコンジュゲートの 1/5~1/10 量を複数の部位に皮下注射することにより追加免疫する。7~14 日後、動物から採血し、血清を抗体価について分析する。好ましくは、動物の追加免疫の際には、同じ抗原ではあるが異なるタンパク質に、および/または、異なる交差結合試薬を介して結合されたコンジュゲートを用いる。コンジュゲートはまた、組換え細胞培養タンパク質融合により作製することもできる。また、免疫応答を増幅するため、ミョウバン等の凝集剤が好ましくは用いられる。選択された哺乳動物抗体は通常、抗原に対して十分に強い結合親和性を有する。抗体の親和性は、飽和結合、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA)、および競合分析 (例えば、放射性免疫分析) により決定することができる。

所望のポリクローナル抗体のスクリーニング法としては、Antibodies, A Labo

- 17 -

ratory Manual (Harlow and David Lane ed (Cold Spring Harbor Laboratory) 1988) に記載されるような慣用の交差結合分析を行うことができる。また、代わりに、例えば、エピトープマッピング (Champe, et al: J Biol Chem 270:1388-1394, 1995) を行ってもよい。ポリペプチドまたは抗体の効力の測定方法として好ましいのは、抗体結合親和性の定量化を用いた方法であるが、その他の態様では、それに加えて、または結合親和性測定に代えて抗体の 1 もしくはそれ以上の生物学的特性を評価する方法を含む。このような分析法は特に、抗体の治療的な有効性を示すので有用である。通常、必ずしもではないが、このような分析において改善された特性を示す抗体はまた、結合親和性も増幅されている。

3. モノクローナル抗体の製造

モノクローナル抗体は単一の抗原部位を認識する抗体であり、均一な特異性により、一般的に多数の異なる抗原部位を認識する抗体を含むポリクローナル抗体よりも有用である。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法 (Kohler, et al: Nature 256:495, 1975) または、組換え DNA 法 (米国特許第 4,816,567 号) 等により製造することができる。

ハイブリドーマ法では、マウス、または、ハムスターもしくはアカゲザル等の他の適当な宿主動物を免疫化に使用したタンパク質に対して特異的に結合する抗体を産生するか、または、産生できるリンパ球を誘導するために上述と同様に免疫化する。また、*in vitro* においてリンパ球を免疫化することもできる。その後、リンパ球をポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてミエローマ細胞と融合させハイブリドーマ細胞を形成させる (Goding: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press) pp.59-103, 1986)。製造されたハイブリドーマ細胞を、好ましくは、未融合の親ミエローマ細胞の生育または成長を阻害する 1 またはそれより多くの物質を含む適当な培養培地に植え、生育させる。例えば、もし親ミエローマ細胞がヒポキサンチングアニンフォスフォリボシルトランスフェラーゼ酵素 (HGPRT または HPRT) を欠く場合、そのハイブリ

- 18 -

ドーマのための培養培地には、典型的には、HGRPT 欠損細胞の生育を阻止する物質ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンが含まれる (HAT 培地)。

好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞において、安定で高いレベルで抗体を産生し、そして、HAT 培地等の培地に対して感受性の細胞である。これらの中で好ましいミエローマセルラインは、Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, USA) より入手できる MOPC-21 および MPC-11 マウス腫瘍由来の細胞、ならびに American Type Culture Collection (Rockville, USA) から入手できる SP-2、または X63-Ag8-653 細胞等のマウスミエローマラインである。ヒトミエローマおよびマウス-ヒト heteromycloma セルラインも、ヒトモノクローナル抗体の産生に用いられてきた (Kozbar: J Immunol 133:3001, 1984、Brodeur, et al: Monoclonal Antibody Production Techniques and Application (Marcel Dekker Inc, New York) pp.51-63, 1987)。

次に、ハイブリドーマ細胞を培養した培地中の、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について分析する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降、または放射免疫分析 (RIA) もしくは酵素結合免疫ソルベント検定法 (ELISA) 等の *in vitro* 結合分析により測定する。所望の特異性、親和性および／または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを限定的希釈法によりサブクロニングし、標準的な方法により生育させる (Goding: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press) pp.59-103, 1986)。この目的に適した培養培地は、例えば、D-MEM または RPMI-1640 である。さらに、ハイブリドーマ細胞は、*in vivo* で動物中の腹水腫瘍として生育させることもできる。サブクロンにより分泌されるモノクローナル抗体は、好ましくは培養培地、腹水液、または血清から、例えば、プロテイン A-セファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィー等の慣用な免疫グロブリン精製方法により分離される。

- 19 -

モノクローナル抗体をコードする DNA は、慣用な方法、例えばモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより容易に単離、配列決定できる。ハイブリドーマ細胞はこのような DNA の好ましい出発材料である。一度単離したならば、DNA を発現ベクターに挿入し、E.coli 細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞または形質転換されなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞へ組み換え、組換え宿主細胞からモノクローナル抗体を産生させる。また別の態様として、McCafferty, et al (Nature 348:552-554, 1990) により記載された技術を用いて製造された抗体ファージライブラリーより、抗体または抗体断片を単離することができる。Clackson, et al (Nature 352:624-628, 1991) および Marks, et al (J Mol Biol 222:581-597, 1991) は、各々、ファージライブラリーを用いたマウスおよびヒト抗体の単離について記載する。次の文献は、高親和性 (nM 範囲) ヒト抗体のチェーンシャッフリングによる製造 (Marks, et al: Bio/Technology 10:779-783, 1992) について、そして、巨大なファージライブラリーを構築するための方法としてのコンビナトリアル感染および *in vivo* 組換え (Waterhouse, et al: Nucl Acids Res 21:2265-2266, 1993) について記載する。これらの技術も、モノクローナル抗体の単離のために従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に代えて利用し得る。

DNA はまた、例えば、ヒト重鎖および軽鎖の定常領域のコード配列をそれに対するマウス配列に代えて置換すること (米国特許第 4,816,567 号; Morrison, et al: Proc Natl Acad Sci USA 81:6851, 1984)、または免疫グロブリンポリペプチドを共有結合により結合させることにより改変することができる。典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、1つの抗原に対して特異性を有する抗原結合部位、および異なる抗原に対して特異性を有する抗原結合部位を有するキメラ二特異性抗体を構築するため、抗体の定常領域で置換するか、また

- 20 -

は抗体の抗原結合部位の可変領域を置換する。

4. 抗体断片の製造

従来、抗体断片は天然の抗体のプロテアーゼによる消化により製造されてきた (Morimoto, et al: J Biochem Biophys Methods 24:107-117, 1992、Brennan, et al: Science 229:81, 1985) が、現在は組換え技術により製造することも可能である。例えば、上述の抗体ファージライブラリーから抗体断片を単離することもできる。また、大腸菌等の宿主より直接 $F(ab')_2$ -SH 断片を回収し、 $F(ab')_2$ 断片の形態に化学的結合させることもできる (Carter, et al: Bio/Technology 10:163-167, 1992)。さらにまた別の方法としては、 $F(ab')_2$ 断片を直接、組換え宿主培養物から単離することもできる。その他、一本鎖抗体および一本鎖抗体等の断片の作製方法は当技術分野において周知である (例えば、米国特許第 4,946,778 号、米国特許第 5,260,203 号、米国特許第 5,091,513 号、米国特許第 5,455,030 号等を参照)。

5. 多特異性抗体の製造

当分野において多特異性抗体の製造法は公知である。全長の二特異性抗体の産生は、異なる特異性を有する 2 つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖の共発現を含むものである (Millstein, et al: Nature 305:537-539, 1983)。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖はランダムに取り合わされるので、共発現を行う得られた複数のハイブリドーマ (クワドローマ) は、各々異なる抗体分子を発現するハイブリドーマの混合物であり、このうち正しい二特異性抗体を産生するものを選択する必要がある。選択はアフィニティクロマトグラフィー等の方法により行うことができる。また、別な方法では所望の結合特異性を有する抗体の可変領域を免疫グロブリンの定常領域配列に融合する。該定常領域配列は、好ましくは免疫グロブリンの重鎖の定常領域のうち、ヒンジ、CH2 および CH3 領域の一部を少なくとも含むものである。好ましくは、さらに軽鎖との結合に必要な重鎖の CH1 領域が含まれる。免疫グロブリン重鎖融合体をコードする DNA、および所望により免疫グロ

- 2 1 -

ブリン軽鎖をコードする DNA をそれぞれ別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に形質転換する。それぞれの鎖の存在割合が同じでないほうが得られる抗体の収量が上がる場合には、別々の発現ベクターに各遺伝子を挿入したほうが、各鎖の発現割合の調節が可能となり都合が良いが、当然ながら、複数の鎖をコードする遺伝子を一つのベクターに挿入して用いることも可能である。

好ましい態様においては、第一の結合特性を有する重鎖がハイブリッド免疫グロブリンの一方の腕として存在し、別の結合特性の重鎖-軽鎖複合体がもう一方の腕として存在する二重特異性抗体が望ましい。このように一方の腕のみに軽鎖を存在させることにより、二重特異性抗体の他の免疫グロブリンからの分離を容易に行うことができる。該分離方法については、国際公開公報第 94/04690 号参照。二重特異性抗体の作製方法については、さらに、Suresh, et al (Methods in Enzymology 121:210, 1986) の方法を参照することができる。組換え細胞培養物から得られる最終産物中のホモダイマーを減らし、ヘテロダイマーの割合を増加させる方法として、抗体の定常領域の CH3 を含み、一方の抗体分子において、他方の分子と結合する表面の 1 もしくは複数の小さな側鎖のアミノ酸を大きな側鎖のアミノ酸（例えば、チロシンやトリプトファン）に変え、他方の抗体分子の対応する部分の大きな側鎖のアミノ酸を小さな側鎖のアミノ酸（例えば、アラニンやスレオニン）に変えて、第一の抗体分子の大きな側鎖に対応する空洞を設ける方法も知られている（国際公開公報第 96/27011 号）。

二重特異性抗体には、例えば、一方の抗体がアビジンに結合され、他方がビオチン等に結合されたようなヘテロ共役抗体が含まれる（米国特許第 4,676,980 号、国際公開公報第 91/00360 号、国際公開公報第 92/00373 号、欧州特許第 03089 号）。このようなヘテロ共役抗体の作製に利用される架橋剤は周知であり、例えば、米国特許第 4,676,980 号にもそのような例が記載されている。

また、抗体断片より二重特異性抗体を製造する方法も報告されている。例えば、化学結合を利用して製造することができる。例えば、まず $F(ab')_2$ 断片を作製し

- 22 -

、同一分子内でのジフルフィド形成を防ぐために、断片をジチオール錯化剤アルサニルナトリウムの存在化で還元する。次に $F(ab')_2$ 断片をチオニトロ安息香酸塩 (TNB) 誘導体に変換する。メルカプトエチルアミンを用いて一方の $F(ab')_2$ -TNB 誘導体を Fab'-チオールに再還元した後、 $F(ab')_2$ -TNB 誘導体および Fab'-チオールを等量混合し、二特異性抗体を製造する。

組換え細胞培養物から直接二重特異性抗体を製造し、単離する方法も、種々報告されている。例えば、ロイシンジッパーを利用した二重特異性抗体の製造方法が報告されている (Kostelny, et al: J Immunol 148:1547-1553, 1992)。まず、Fos および Jun タンパク質のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合により異なる抗体の Fab' 部分に連結させ、ホモダイマーの抗体をヒンジ領域においてモノマーを形成するように還元し、抗体ヘテロダイマーとなるように再酸化する。また、軽鎖可変領域 (VL) に重鎖可変領域 (VH) を、これら 2 つの領域間でのペアを形成できないくらいに短いリンカーを介して連結することで、相補的な別の VL および VH 領域とペアを形成させ、それにより 2 つの抗原結合部位を形成させる方法もある (Hollinger, et al: Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448, 1993)。また、一本鎖 Fv (sFV) を用いたダイマーについても報告されている (Gruger, et al: J Immunol 152:5368, 1994)。さらに、二重特異性ではなく三重特異性の抗体についても報告されている (Tutt, et al: J Immunol 147:60, 1991)。

6. ヒト化抗体の製造

ヒト化抗体は、免疫原 (抗原) をヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物に免疫し、既存の一般的な抗体産生方法によって取得することができる。用いるヒト抗体産生非ヒト哺乳動物、特にヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製方法は公知である (Nature Genetics 7:13-21, 1994、Nature Genetics 15:146-156, 1997、特表平 4-504365 号公報、特表平 7-509137 号公報、日経サイエンス 6:40-50, 1995、国際公開公報 94/25585 号、Nature 368:856-859, 1994

- 23 -

、特表平 6-500233 号公報等)。該ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、具体的には次のような手順により製造することができる。

(1) 非ヒト哺乳動物の内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子等）で置換することによる、該動物内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子が機能的に不活性化されたノックアウト非ヒト哺乳動物を作製する工程、

(2) 非ヒト哺乳動物の内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の少なくとも一部を相同組換えにより薬剤耐性マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子等）で置換することによる、該動物内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子（特に κ 鎖遺伝子）が機能的に不活性化されたノックアウト非ヒト哺乳動物を作製する工程、

(3) 酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome ; YAC) ベクター等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターに用いて、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製する工程、

(4) YAC 等に代表されるような巨大遺伝子を運搬可能なベクターを用いて、ヒト免疫グロブリン軽鎖（特に κ 鎖）遺伝子座の所望の領域がマウス染色体中に組み込まれたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製する工程、

(5) 前記 (1) ～ (4) のノックアウト非ヒト哺乳動物およびトランスジェニック非ヒト哺乳動物を任意の順序で交配することにより、非ヒト哺乳動物内在性免疫グロブリン重鎖遺伝子座および非ヒト哺乳動物内在性免疫グロブリン軽鎖遺伝子座がともに機能的に不活性化され、かつヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座の所望の領域およびヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座の所望の領域が共に非哺乳動物染色体上に組み込まれたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製する工程。

上述のように、非ヒト哺乳動物の内在性免疫グロブリン遺伝子座の適当な領域を外来性マーカー遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子等）で相同組換えにより置換することにより該遺伝子座が再構成できないように不活性化することが

- 24 -

できる。該相同組換えを用いた不活性化には、例えば、ポジティブネガティブセレクション (positive negative selection ; PNS) と呼ばれる方法を用いることができる (日経サイエンス 5:52-62, 1994)。また、免疫グロブリン重鎖遺伝子座の機能的な不活性化には、例えば、J 領域または C 領域 (例えば C μ 領域) の一部に障害を導入することにより達成でき、免疫グロブリン軽鎖 (例えば κ 鎖) の機能的な不活性化には、例えば、J 領域もしくは C 領域の一部、または J 領域および C 領域にまたがる領域を含む領域に障害を導入することにより達成可能である。

トランスジェニック動物は、通常の方法により製造することができる (例えば、最新動物細胞実験マニュアル、第 7 章 (エル・アイ・シー) pp.361-408, 1990)。具体的には、例えば、正常な非ヒト動物胚盤胞に由来するヒポキサンチングアニンフォスホリボシルトランスフェラーゼ (HRPT) 陰性胚性幹 (ES) 細胞を、該ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座または軽鎖遺伝子座をコードする遺伝子またはその一部、ならびに HRPT 遺伝子が挿入された YAC ベクターを含む酵母とスフェロプラスト融合法により融合する。該外来遺伝子がマウス内在性遺伝子上にインテグレートされた ES 細胞を HAT セレクションにより選別する。次いで、選別した ES 細胞を別の正常な非ヒト哺乳動物から取得した受精卵 (胚盤胞) にマイクロインジェクションする (Proc Natl Acad Sci USA 77:7380-7384, 1980、米国特許第 4,873,191 号)。該胚盤胞を仮親となる別の非ヒト哺乳動物の子宮に移植することにより、キメラトランスジェニック非ヒト哺乳動物が誕生する。該キメラ動物を正常な非ヒト哺乳動物と交配させ、ヘテロトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得る。該ヘテロ動物同士を交配することにより、メンデルの法則に従い、ホモトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができる。

また、遺伝子組換え技術により、そのようなヒト化抗体の重鎖および軽鎖の各々をコードする cDNA、好ましくは該 cDNA を含むベクターにより宿主を形質転換して得られる遺伝子組換え宿主であって、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体

- 25 -

を産生する宿主を培養することにより、培養上清中から得ることもできる。ここで、該宿主は受精卵以外の真核細胞、好ましくは CHO 細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞である。

本発明の方法により安定化された抗体の抗原結合活性は、特に限定はされないが、アミノ酸置換前の活性の 70%以上を有していることが好ましく、より好ましくは 80%以上であり、さらに好ましいのは 90%以上である。

図面の簡単な説明

図 1 は、国際公開公報第 99/51743 号に記載されている抗ヒト TF 抗体に含まれるヒト型化重鎖バージョン i およびヒト型化軽鎖バージョン b2 のアミノ酸配列を示した図である。脱アミド化される可能性のある複数のアスパラギン (Asn28、Asn51、Asn55) を四角で囲み、示す。

図 2 は、抗ヒト TF 抗体の重鎖可変領域 (AHi) が組み込まれたクローニングベクター pCVIDEC-AHi を示した図である。

A: pCVIDEC-AHi ベクターの全体図、B: 重鎖可変領域の Nhe I-Sal I 断片図。

図 3 は、抗ヒト TF 抗体各変異体およびオリジナル抗ヒト TF 抗体の陰イオン交換クロマトグラムを示した図である。

A: 99D01、B: オリジナル (ネイティブ)。

図 4 は、抗ヒト TF 抗体各変異体およびオリジナル抗ヒト TF 抗体の陰イオン交換クロマトグラムを示した図である。

C: N28D、D: N51D。

図 5 は、抗ヒト TF 抗体各変異体およびオリジナル抗ヒト TF 抗体の陰イオン交換クロマトグラムを示した図である。

E: N54D、F: N51D/N54D。

図 6 は、抗ヒト TF 抗体各変異体およびオリジナル抗ヒト TF 抗体の陰イオン交換クロマトグラムを重ね合わせて示した図である。

- 26 -

図 7 は、抗ヒト TF 抗体各変異体およびオリジナル抗ヒト TF 抗体の結合活性を示した図である。

図 8 は、抗ヒト TF 抗体各変異体およびオリジナル抗ヒト TF 抗体の中和活性を示した図である。

図 9 は、抗ヒト TF 抗体の重鎖可変領域 (AHi) が組み込まれたクローニングベクター pCVIDEC-AHi を示した図である。なお、図 9 に記載の塩基配列を配列番号 : 27、28 に示した。

A: pCVIDEC-AHi ベクターの全体図、B: 重鎖可変領域の Xba I-Bal I 断片図、C: 重鎖可変領域の Xba I-Apo I 断片図。

図 10 は、抗ヒト TF 抗体各変異体の結合活性の比較を示した図である。抗ヒト TF 抗体 bulk (Lot No.00C01) で作製した検量線を基に算出した抗ヒト TF 抗体濃度換算値を示す。

ブランク: 10% FCS- α -MEM 培地、コントロール: CHO 細胞培養上清、G~P: 抗ヒト TF 抗体重鎖内 Gly55 各変異体。

図 11 は、抗ヒト TF 抗体各変異体の結合活性を示した図である。

図 12 は、抗ヒト TF 抗体各変異体および抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) の溶出プロファイルを示した図である。

図 13 は、抗ヒト TF 抗体各変異体および抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) について加速試験前後の結合活性および初期値との比を示した図である。

図 14 は、抗ヒト TF 抗体各変異体および抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) について加速試験前後の陰イオンクロマトグラフおよび中和活性を示した図である。

A: 99D01(G55G)、B: G55L、C: G55I、D: G55F、E: G55E、F: G55K。

図 15 は、抗ヒト TF 抗体各変異体および抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) について加速試験前後の陰イオンクロマトグラフおよび中和活性を示した図である。

A: 99D01(G55G)、B: G55L、C: G55I、D: G55F、E: G55E、F: G55K。

図 16 は、抗ヒト TF 抗体各変異体および抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) について

- 27 -

て加速試験前の中和活性を示した図である。

図 17 は、抗ヒト TF 抗体各変異体および抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) について加速試験前後の中和活性を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は下記の実施例によりいかなる意味でも限定されるものではない。

【実施例 1】 抗ヒト TF 抗体 Asn54 置換変異体の TF との結合活性および中和活性の測定

国際公開公報第 99/51743 号に記載されているヒト組織因子 (tissue factor ; TF) に対するヒト型化抗体は、内因性血液凝固反応における TF を介した第 X 因子の活性化を阻害することにより、外因性血液凝固反応を抑制せずに血栓形成を抑制することが期待されている。この抗ヒト TF 抗体は、ヒト型化重鎖バージョン i (配列番号 : 25、図 1) およびヒト型化軽鎖バージョン b2 (配列番号 : 26、図 1) を含んでおり、重鎖可変領域内の CDR2 に存在する Asn51 および Asn54、重鎖可変領域内の FR1 に存在する Asn28 など、脱アミド化される可能性のある複数のアスパラギンを有している。特に Asn54 は Asn-Gly 配列を有しており、脱アミド化が起こりやすいと考えられる。

該抗体は、製剤処方されておらず、抗体が不安定かするような条件下では、溶液 pH 依存的に TF に対する結合活性が低下し、低 pI 分子種が増加することが観察されている。塩基性が強くなると変性が強くなることから、この結合活性の低下と低 pI 分子種の増加は、抗ヒト TF 抗体を構成するアミノ酸の脱アミド化に起因するものと予想されており、さらに、抗原結合活性の低下も併せて観察されることから、CDR 領域において脱アミド化が起こっていることが考えられる。

これらの知見に基づき、国際公開公報第 99/51743 号に記載されている抗ヒト TF 抗体の重鎖可変領域内の CDR2 に存在する Asn51 および Asn54、ならびに重鎖

- 28 -

可変領域内の FR1 に存在する Asn28 をアスパラギン酸に置換した変異体 (N51D 変異体、N54D 変異体、N51D/N54D 二重変異体、および N28D 変異体の 4 種類) を作製し、TF との結合活性および中和活性を測定した。

抗体のアミノ酸配列は、Kabat ら (Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman K S, Foeller C: Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. (US Dept. Health and Human Services, Bethesda, Md) 1991) の表記に従った。

1. 抗ヒト TF 抗体変異体発現ベクターの構築

抗ヒト TF 抗体の重鎖可変領域 (AHi) が組み込まれたクローニングベクター pCVIDEC-AHi (図 2 A) と抗ヒト TF 抗体発現ベクター pN5KG4P-AHi-ALb2 を、 dam^- / dcm^- である大腸菌 SCS110 より精製した。

pCVIDEC-AHi 上で、Asn をコードするコドン Asp に置換する操作を行った。すなわち、それぞれの Asn をコードする領域を含む 30bp 程度の断片を制限酵素で切り出し、塩基置換を入れた合成オリゴ DNA で作製した断片に入れ替えた (図 2 B)。Asn51 および Asn54 を改変するためには、pCVIDEC-AHi を Xba I および B al I で消化し、抗ヒト TF 抗体の重鎖可変領域内 CDR2 にある Asn51 と Asn54 をそれぞれ、もしくは両方を Asp に変えるように、コドンを一塩基対置換するように設計した断片を組み込んだ。Asn28 を改変するためには、pCVIDEC-AHi を Mro I および EcoT22 I で消化し、抗ヒト TF 抗体の重鎖可変領域内 FR1 にある Asn28 を Asp に変えるように、コドンを一塩基対置換するように設計した断片を組み込んだ。

配列の確認は、発現ベクターを構築するステップごとに行った。クローニングベクター上で目的の配列を確認し、Nhe I と Sal I で消化して得られた断片を、Nhe I と Sal I で消化した抗ヒト TF 抗体発現ベクターの重鎖可変領域と入れ替え、再度配列を確認した。目的の配列が得られたことを確認した後に、大腸菌 D H5 α を形質転換し、QIAGEN Maxi column を用いて、N51D 変異体発現ベクター、N54D 変異体発現ベクター、N51D/N54D 二重変異体発現ベクター、および N28D 変異

体発現ベクターの4種類の抗ヒト TF 抗体変異体発現ベクターを精製した。

2. COS-7 細胞における抗ヒト TF 抗体変異体の一過性発現

構築した各変異体の発現ベクターおよびオリジナル抗ヒト TF 抗体発現ベクター、計5種類を electroporation 法により COS-7 細胞に導入し、一過性に発現させた。COS-7 細胞を D-PBS (-) で洗浄した後、約 $0.3 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/ml となるように PBS に懸濁した。10 μ g の抗ヒト TF 抗体変異体発現ベクターと共に 0.4cm キュベットに移し、1.5kV、25 μ F の条件で electroporation を行った。10 分間静置した後、30ml の 10% FCS-DMEM 培地に懸濁した。翌日、死細胞などを培地と共に除去し、10% FCS-DMEM 培地を新たに 50ml 加えた。細胞を3日間培養した後、培養上清を回収した。

3. 抗ヒト TF 抗体変異体の発現量の測定

3-1 direct ELISA による発現量の測定

遺伝子導入した COS-7 細胞の培養上清を 96 穴 ELISA プレートに 100 μ l ずつ播き、一晚固相化した。同様に、検量線用として、DMEM 培地で 1~1000ng/ml に段階希釈した抗ヒト TF 抗体 (Lot No.00C01) を 96 穴 ELISA プレートに 100 μ l ずつ播き、固相化した。ELISA 用希釈バッファーでブロッキングした後、HRP 標識抗 IgG 抗体を反応させ、TMB で発色させた。2M 硫酸で反応を停止し、ARVO-SX5 を用いて 450nm の吸光度を測定した。検量線用に播いた抗ヒト TF 抗体 (Lot No. 00C01) の値から、培養上清中の抗ヒト TF 抗体量を算出した。

direct ELISA の結果、表 1 に示すように、抗ヒト TF 抗体の濃度は約 65~100ng/ml、総発現量は約 3~5 μ g であった。

- 30 -

表 1

	濃度 (ng/mL)	用量 (mL)	総発現量 (μ g)
オリジナル	98.710	50	4.9
N28D	84.535	50	4.2
N51D	75.634	50	3.8
N54D	77.956	50	3.9
N51D/N54D	68.387	50	3.4

4. 抗ヒト TF 抗体各変異体の精製

回収した各 50ml の培養上清から、アフィニティクロマトグラフィー (Protein A) および陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q) により各変異体を精製した。

4-1 アフィニティクロマトグラフィー

以下の条件でアフィニティクロマトグラフィーを行った。

システム : SMART System (アマシャムファルマシアバイオテク)

カラム : HiTrap Protein A HP (0.7cm ϕ ×2.5cm、1ml、アマシャムファルマシアバイオテク)

平衡化緩衝液 : D-PBS (－)

洗浄用緩衝液 : 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)

溶出用緩衝液 : 50mM 酢酸 (pH 2～3)

0.5M リン酸 2 ナトリウム溶液でサンプルの pH を 7.4 に調整した後、セントリプレップ-50 で 5 倍に濃縮し、10ml (10C.V.) の平衡化緩衝液で平衡化したカラムに流速 1ml/分で添加した。5ml (5C.V.) の洗浄用緩衝液を用いて流速 0.5ml/

- 3 1 -

分で洗浄した後、5ml (5C.V.) の溶出用緩衝液で溶出し、0.5ml ずつ 10 画分に分けて回収した。抗体を含む 4 画分を合わせて、0.1ml の 1M Tris base を添加して pH 6~7 に中和した。

4-2 陰イオン交換クロマトグラフィー

次に、以下の条件で陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。

システム : SMART System (アマシャムファルマシアバイオテク)

カラム : Mono Q PC 1.6/5 (0.16cm ϕ ×5cm、0.1ml、アマシャムファルマシアバイオテク)

緩衝液 A : 50mM Tris-HCl (pH 8.0)

緩衝液 B : 50mM Tris-HCl (pH 8.0) / 0.5M NaCl

アフィニティクロマトグラフィーによる Protein A 溶出画分に 0.1ml の 1M Tris base を添加し、pH 8~9 に調整して、サンプルを調製した。流速 200 μ l/分でサンプルを添加した後、流速 50 μ l/分にて、0%B/5 分、0~60%B/30 分、60~100%B/10 分、100%B/10 分のグラジエントプログラムでグラジエント溶出した。50 μ l ずつ分画し、抗体を含む 2~4 画分を合わせて活性測定に供した。

アフィニティクロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、0.5~1.0 μ g の抗体を得た。各変異体の陰イオン交換クロマトグラムを図 3~5 に、各変異体のクロマトグラムを重ね合わせたものを図 6 に示す。また、タンパク質量、回収率を表 2 に示す。N54D 変異体および N51D/N54D 二重変異体はほぼシングルピークとして得られたが、オリジナル抗ヒト TF 抗体、N51D 変異体、N28D 変異体はサブピークを生じ、特に N51D 変異体は 2 本のサブピークを生じた上にその含量も高かった。

- 3 2 -

表 2

	ピーク No.	初期タンパク 質量 (μg)	濃度 (ng/mL)	用量 (mL)	総タンパク 質量 (μg)	回収率 (%)
オリジナル	1	4.9	6969.568	0.10	0.70	16.5
	2		734.883	0.15	0.11	
N28D	1	4.2	5436.713	0.15	0.82	20.7
	2		320.086	0.15	0.05	
N51D	1	3.8	2643.388	0.15	0.40	18.2
	2		2724.396	0.10	0.27	
	3		143.479	0.15	0.02	
N54D		3.9	2811.046	0.20	0.56	14.4
N51D/N54D		3.4	5255.977	0.20	1.05	30.9

5. TF 結合活性の測定

biotin 化抗ヒト TF 抗体を用いた competitive ELISA により TF 結合活性を測定した。抗ヒト TF 抗体各変異体を COS-7 細胞で発現させ、Protein A アフィニティクロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製したものをサンプルとして使用した。オリジナル抗ヒト TF 抗体、N28D 変異体および N51D 変異体については、陰イオン交換クロマトグラフィーで認められたサブピークについても測定した。抗ヒト TF 抗体原体には Lot No.00C01 を使用した。

shTF を coating buffer (以下 CB) で 20nM に調整し、96 穴プレートに 100 μl /穴ずつ分注し、4°Cで一晩放置した。rinse buffer (以下 RB) で 3 回洗浄した後、dilution buffer (以下 DB) を 200 μl/穴ずつ分注し、室温で 2 時間放置してブロッキングした。DB を除去した後、10,000 倍希釈した biotin 化抗ヒト TF 抗体を含む DB にて 2 倍段階希釈したサンプルを 100 μl/穴ずつ加え、室温で 1 時間放置した。RB で 3 回洗浄した後、DB にて 5,000 倍希釈した ALP-streptavidine を 100 μl/穴ずつ分注し、室温で 1 時間放置した。RB で 5 回洗浄した後、su

- 33 -

strate buffer (以下 SB) で 1mg/ml に調整した SIGMA104 を分注し、室温で 30 分間放置して発色させ、マイクロプレートリーダーにより測定波長 405nm、対照波長 655nm で測定した。

結合活性の評価は以下のように行った。オリジナル抗ヒト TF 抗体の濃度（対数変換値）－吸光度について直線回帰し、スタンダード直線を求めた。このスタンダード直線を用いて、62.5～500ng/ml の範囲に含まれる各サンプルの吸光度をスタンダード抗体濃度（Cc）に換算した。Cc を添加した抗体濃度（Ca）で除し、同一の結合活性を示すスタンダード抗体に対するサンプル濃度比を求め、結合活性とした。

結合活性の測定結果を図 7 および表 3 に示す。各変異体の結合活性はいずれもオリジナル抗ヒト TF 抗体より低下していた。CDR2 に存在し、最も脱アミド化の可能性が高いと考えられる Asn54 の変異体（N54D 変異体）の結合活性は、オリジナル抗ヒト TF 抗体の約 10% に低下していた。Asn54 と同じく CDR2 に存在する Asn51 の変異体（N51D 変異体）の結合活性はオリジナル抗ヒト TF 抗体の約 50% であり、N54D 変異体よりも結合活性の低下の程度は小さかった。Asn51 および Asn54 の両アミノ酸の変異体である N51D/N54D 二重変異体の結合活性は、N54D 変異体よりもさらに低下していた。一方、FR1 に存在する Asn28 の変異体（N28D 変異体）の結合活性は、オリジナル抗ヒト TF 抗体の約 94% とわずかな低下が見られたのみであった。これらのことから、CDR2 に存在する Asn51、Asn54 の脱アミド化、特に Asn54 の脱アミド化は、結合活性を大きく低下させることが示唆された。

また、オリジナル抗ヒト TF 抗体、N28D 変異体および N51D 変異体で見られたサブピーク（ピーク 2）の結合活性をメインピーク（ピーク 1）と比較したところ、いずれにおいてもサブピークの結合活性はメインピークよりも低下していた。

- 3 4 -

表 3

	結合活性	
	ピーク 1	ピーク 2
ネイティブ	100 %	70.6 %
N28D	93.9 %	46.3 %
N51D	49.2 %	29.0 %
N54D	9.2 %	
N51D/N54D	7.0 %	

6. TF 中和活性の測定

hTF (Thromborel S)、Factor VIIa および Factor X を用いて TF 中和活性を測定した。抗ヒト TF 抗体各変異体は、結合活性を測定したものと同じく、COS-7 細胞で発現させて Protein A アフィニティクロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーで精製したものを使用した。抗ヒト TF 抗体原体には Lot No.00C01 を使用した。

Assay Buffer (5mM CaCl_2 および 0.1% BSA を含む TBS (pH 7.49)、以下 AB) を用いて、凝固因子 Factor VIIa を 0.1PEU/ml に、また Thromborel S を 120 倍 (v/v) に希釈した。これらの混合溶液を 60 μl /穴ずつプレートに分注し、室温で 60 分間静置した。AB で Factor X を 0.25PEU/ml に希釈した ABX をサンプルの希釈に用い、目的の濃度に希釈したサンプルを 40 μl /穴ずつプレートに分注した。室温で 30 分間静置した後、500mM EDTA を 10 μl /穴ずつ加えて反応を停止した。発色基質である S-2222 の水溶液 1 に対して、Milli Q H_2O を 1 および 0.6mg/ml ヘキサメチリンブロマイド水溶液を 2 の割合で混合し、S-2222 混合液を調製した。S-2222 混合液を 50 μl /穴ずつプレートに分注し、室温で静置した。30 分後にマイクロプレートリーダーにより測定波長 405nm、対照波長 655nm で測定した。

中和活性の測定結果を図 8 および表 4 に示す。抗ヒト TF 抗体原体をスタンダ

- 3 5 -

ードとして各変異体の濃度を算出し、抗ヒト TF 抗体原体に対する中和活性比を求めた。なお、中和活性比は、すべてのサンプルにおいて測定可能であった 250 ng/ml の添加濃度を基準とした。オリジナル抗ヒト TF 抗体および N28D 変異体は、抗ヒト TF 抗体原体とほぼ同等の中和活性を保持しており、FR に存在する Asn28 の脱アミド化は中和活性の低下に影響しないと考えられた。

一方、N51D 変異体および N54D 変異体では、抗ヒト TF 抗体原体に対する中和活性比がそれぞれ 65.6% および 19.9% にまで低下しており、抗ヒト TF 抗体の CDR に存在する Asn51 および Asn54 の脱アミド化が中和活性の低下を引き起こすことが強く示唆された。

表 4

	添加濃度 (ng/mL)	算出濃度 (ng/mL)	中和活性比 (%)
N28D	250	253	101
N51D	250	164	65.6
N54D	250	49.8	19.9
N51D+N54D	250	31.3	12.5
Native	250	248	99.1

以上の結果から、製剤処方されておらず、抗体が不安定化するような条件下での、溶液 pH 依存的な TF に対する結合活性の低下と低 pI 分子種の増加は、主に CDR2 領域に存在する Asn54 の脱アミド化によるものであることが判明した。

〔実施例 2〕 抗ヒト TF 抗体 Gly55 置換変異体の TF との結合活性および中和活性の測定

国際公開公報第 99/51743 号に記載されている抗ヒト TF 抗体は、ヒト型化重鎖バージョン i (配列番号：25、図 1) およびヒト型化軽鎖バージョン b2 (配列番号：26、図 1) を含んでいる。そのアミノ酸配列を基に、CDR2 のループを構成する上で重要なアミノ酸と考えられる重鎖 CDR2 内の Gly55 を他の 19 種のア

- 36 -

ミノ酸に換えた変異体を作製し、TF への結合活性を測定した。また、Gly55 を Ile、Leu、Phe、Glu、Lys に置換した変異体について、中和活性および脱アミド化を観察した。

抗体のアミノ酸配列は、Kabat ら (Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman K S, Foeller C: Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. (US Dept. Health and Human Services, Bethesda, Md) 1991) の表記に従った。

1. 抗ヒト TF 抗体変異体発現ベクターの構築

抗ヒト TF 抗体重鎖可変領域 (AHi) が組み込まれたクローニングベクター pCVIDEC-AHi (図 9 A) と抗ヒト TF 抗体発現ベクター pN5KG4P-AHi-ALb2 を、 dam^-/dc m^- である大腸菌 SCS110 より精製した。

pCVIDEC-AHi 上で、Gly55 をコードするコドン进行他のアミノ酸に置換する操作を行った。このとき、3 番目のコドンを C に固定できる 15 種類のアミノ酸については、Asn54-Gly55 をコードする領域を含む 30bp 程度の断片を pCVIDEC-AHi のユニークサイトである Xba I-Bal I で切り出し、Gly55 をコードするコドンの 3' 端の 2 塩基をランダムな核酸とした合成オリゴ DNA で作製した断片を組み込んだ (図 9 B)。Xba I-Bal I 断片は、抗ヒト TF 抗体重鎖可変領域内の CDR2 にある Gly55 の 1 番目と 2 番目のコドンがランダムな塩基配列となるように vent polymerase (NEB 社) で 3' 端の 2 塩基を伸長した後、Xba I で消化して作製した。この方法により、哺乳類でコドン使用頻度の高い 15 種類の変異体を 1 回の操作で作製することが可能と考えられたが、最適反応条件を見出せなかったため、実際には 8 種類の変異体しか作製できなかった。そこで、これら以外の変異体について、他の制限酵素部位を使用して構築することにした。

Gly55 の 3 番目のコドンを変換する必要があるアミノ酸、および上記の方法で作製できなかった変異体については、pCVIDEC-AHi の EcoR I サイトを Hind III に変えたものを作製し、pCVIDEC-AHi のユニークサイトである Apo I-Xba I で消化した後、合成オリゴ DNA で作製した断片を組み込んだ。すなわち、Xba I-Bal

- 37 -

I 以外の制限酵素部位としては、Apo I-Xba I が使用可能と考えられたが、Apo I はベクター上の EcoR I サイトを切断してしまうため、まず EcoR I サイトを Hind III サイトに変えて、EcoR I サイトを除去した。Apo I-Xba I 断片は約 55bp なので、Gly55 をコードするコドン进行他のアミノ酸に変えた塩基配列の前後が合わせて 16bp 程度重なるように合成オリゴ DNA を作製し、アニーリングさせた後、Vent polymerase で伸長し、Apo I-Xba I で消化して作製した（図 9C、表 5）。

- 3 8 -

表 5

EcoRI サイト削除アダプター		Hind III
G AATTC		AATTGGAAGCTTGC
CTTAA G		CCTTCGAACGTAA
H-G56M プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATATGC	
H-G56M プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGCATATTCGCAGGAT	
H-G56K プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATAAGCAT	
H-G56K プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGCTTATTCGCAGGAT	
H-G56W プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATTGGCAT	
H-G56W プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGCCAATTCGCAGGAT	
H-G56Q プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATCAGCAT	
H-G56Q プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGCTGATTCGCAGGAT	
H-G56E プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATGAGCAT	
H-G56E プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGCTCATTCGCAGGAT	
H-G56F プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATTTCCAT	
H-G56F プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGGAAATTCGCAGGAT	
H-G56T プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATACCCAT	
H-G56T プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGGGTATTCGCAGGAT	
H-G56N プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATAACCAT	
H-G56N プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGGTTATTCGCAGGAT	
H-G56D プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATGACCAT	
H-G56D プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGGTCATTCGCAGGAT	
H-G56P プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATCCCCAT	
H-G56P プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGGGGATTCGCAGGAT	
H-G56C プライマー-F	GAGTCTAGAATGGATTGGTGGGAATGATCCTGCGAATTGCCAT	
H-G56C プライマー-R	GAGAATTTCTGGGTCATACATACTATGGCAATTCGCAGGAT	

Xba I-Apo I サイトを用いた抗ヒト TF 抗体変異体構築のためのプライマーを示す。

- 39 -

なお、表 5 に記載の塩基配列を配列番号：1 から 24 に示した。

クローニングベクター上で構築した 19 種類の抗ヒト TF 抗体変異体の配列をシーケンサーにより確認した。また、Nhe I と Sal I で消化して得られた変異重鎖可変領域を、Nhe I と Sal I で消化した抗ヒト TF 抗体発現ベクターの重鎖可変領域と入れ替え、変異体発現ベクターを構築して再度配列を確認した。目的の配列が得られたことを確認した後に、大腸菌 DH5 α を用いて抗ヒト TF 抗体変異体発現ベクターを増やし、QIAGEN Maxi column を用いて精製し、配列確認を行った。こうして、19 種類の抗ヒト TF 抗体変異体発現ベクターを得た。

2. CHO 細胞における抗ヒト TF 抗体変異体の一過性発現

構築した抗ヒト TF 抗体重鎖内 Gly55 変異体発現ベクターおよび Gly55 未置換体 (Gly55Gly) 発現ベクター、計 20 種類を lipofection 法により CHO 細胞に導入し、一過性に発現させた。CHO (dhfr⁻) 細胞は、10% FCS- α -MEM 培地を用いて 37°C、5% CO₂ 気相下にて培養した。lipofection を行う前日に、CHO 細胞を 1×10^5 細胞/穴となるように 12 穴プレートに播き、37°C、5% CO₂ 下にて培養した。

100 μ l の Opti-MEM (Gibco 社) に 6 μ l の FuGENE6 Transfection Reagent (BOEHRINGER MANNHEIM 社) を加え、5 分間静置した後、各 1 μ g の抗ヒト TF 抗体重鎖内 Gly55 変異体発現ベクター pN5KG4P-AHi-Alb2-G55X (X : 20 種類の各アミノ酸) が入ったチューブに加えた。そのまま 20 分間放置し、FuGENE6/DNA 複合体を形成させた。前日に播種した CHO 細胞の培地を除去した後、10% FCS- α -MEM 培地を新たに 2ml/穴ずつ添加した。さらに、FuGENE6/DNA 複合体をそれぞれ triplicate でプレートに添加した。

37°C、5% CO₂ 下で 1 日培養した後、プレートを PBS で洗浄した。10% FCS- α -MEM 培地を 3ml/穴ずつ添加して培地交換を行った。37°C、5% CO₂ 下で 7 日間培養した後、約 9ml の抗ヒト TF 抗体変異体含有培養上清を 15ml チューブに移し、1000rpm で 5 分間遠心して、限外濾過により約 10 倍に濃縮した。得られた培

- 40 -

養上清を抗ヒト TF 抗体重鎖内 Gly55Xaa 変異体サンプルとした。

3. TF 結合活性の測定

抗ヒト TF 抗体重鎖内 Gly55Xaa 変異体サンプルの human IgG 含量を測定し、それぞれのサンプルの IgG 濃度が 100ng/ml になるように調整した。

biotin 化抗ヒト TF 抗体を用いた competitive ELISA により TF 結合活性を測定した。shTF を CB で 20nM に調整し、96 穴プレートに 100 μ l/穴ずつ分注し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。RB で 3 回洗浄した後、DB を 200 μ l/穴ずつ分注し、室温で 2 時間放置してブロッキングした。DB を除去した後、最終濃度で 10,000 倍希釈した biotin 化抗ヒト TF 抗体を含む DB にて 2 倍段階希釈したサンプルおよびスタンダードを 100 μ l/穴ずつ加え、室温で 1 時間放置した。RB で 3 回洗浄した後、DB にて 8,000 倍希釈した ALP-streptavidine を 100 μ l/穴ずつ分注し、室温で 1 時間放置した。RB で 3 回洗浄した後、SB で 1mg/ml に調整した SIGMA104 を分注し、室温で約 20 分間放置して発色させ、マイクロプレートリーダーにより測定波長 405nm、対照波長 655nm で測定した。

結合活性は、以下の手順に従って 50%活性を示す濃度を求めて比較した。サンプル（－）、biotin 化抗体（＋）の吸光度を 100%として各測定点の吸光度を%に換算した。各サンプルの 50%値を挟む 2 点を基に、濃度（対数変換値）－吸光度（%）の直線回帰式を求め、吸光度が 50%となる濃度を算出し、数式 1 より各サンプルの結合活性を算出した。

数式 1：結合活性＝（スタンダード抗体の 50%活性濃度）／（サンプルの 50%活性濃度） \times 100

図 10 に、抗ヒト TF 抗体 bulk (Lot No.00C01) で作製した検量線を基に算出した抗ヒト TF 抗体濃度換算値を示した。CHO 細胞で発現させた Gly55 未置換体 (Gly55Gly) は、抗ヒト TF 抗体 bulk とほぼ同等の TF 結合活性を保持していた。Gly55 変異体では、Gly55Val、Gly55Ile、Gly55Pro において結合活性の低下が認められた。

- 4 1 -

抗ヒト TF 抗体重鎖 Gly55 変異体の TF 結合活性を詳細に検討するために、以下の検討を行った。すなわち、抗ヒト TF 抗体変異体を用い、25～200ng/ml の範囲内でサンプル添加量を変化させ、TF 結合活性を competitive ELISA 法により測定した。なお、サンプル量不足のため、Gly55Asn および Gly55Asp については実施しなかった。

測定結果を図 1 1 に示す。今回検討した 18 種類の抗ヒト TF 抗体重鎖 Gly55 変異体中では、Gly55Val、Gly55Ile、および Gly55Pro の TF 結合活性が、抗ヒト TF 抗体 bulk (Lot No.00C01) や Gly55 未置換体 (Gly55Gly) に比べて著しく低下していることが確認された。しかしながら、それ以外の 15 種類の変異体については、TF 結合活性に顕著な差は見出せなかった。したがって、Gly55 を他のアミノ酸に変えても、TF 結合活性は維持できると考えられた。

4. TF 中和活性の測定

AB を用いて、凝固因子 Factor VIIa を 0.1PEU/ml に、また Thromborel S を 120 倍 (v/v) に希釈した。これらの混合溶液を 60 μ l/穴ずつプレートに分注し、室温で 60 分間静置した。10 mM リン酸バッファーで 2 倍段階希釈したサンプルを、20 μ l/穴ずつ分注した後、CaCl₂ 溶液で CaCl₂ 濃度を 10mM に調整した AB を用いて 0.5PEU/ml に希釈した凝固因子 Factor X 溶液を 20 μ l/穴ずつプレートに分注した。室温で 30 分間静置した後、500mM EDTA を 10 μ l/穴ずつ加えて反応を停止した。テストチーム発色基質 S-2222 溶液とポリブレン溶液を 1:1 で混合した溶液を 50 μ l/穴ずつプレートに分注して、室温で静置した。30 分後にマイクロプレートリーダーにより測定波長 405nm、対照波長 655nm で測定した。

中和活性は、以下の手順に従って 50%活性を示す濃度を求めて比較した。サンプル (－)、凝固因子 Factor X (+) の吸光度を 100%、サンプル (－)、凝固因子 Factor X (－) の吸光度を 0%として、各測定点の吸光度を%に換算した。各サンプルの 50%値を挟む 2 点を基に、濃度 (対数変換値) - 吸光度 (%) の直線回帰式を求め、吸光度が 50%となる濃度を算出し、数式 2 より各サンプ

- 4 2 -

ルの中和活性を算出した。

数式 2：中和活性 (IC50) = (スタンダード抗体の 50% 活性濃度) / (サンプルの 50% 活性濃度) × 100

5. CHO 細胞を用いた抗ヒト TF 抗体変異体の安定発現系の構築

Gly55 を Leu (脂肪族アミノ酸)、Phe (芳香族アミノ酸)、Glu (酸性アミノ酸)、Lys (塩基性アミノ酸)、Ile (分枝脂肪族アミノ酸) に置換した Gly55Leu、Gly55Phe、Gly55Glu、Gly55Lys、Gly55Ile の 5 種類の変異体について、安定発現系を構築することにより、抗ヒト TF 抗体変異体の活性を比較するのに十分な量を産生させた。

5-1 CHO 細胞への遺伝子導入

CHO (dhfr-) 細胞を PBS で洗浄した後、約 1×10^7 細胞/ml となるように PBS に懸濁した。10 μ g の抗ヒト TF 抗体重鎖内 Gly55 変異体発現ベクター pN5KG4P-A Hi -Alb2-G55X と共に 0.4cm キュベットに移し、1.5kV、25 μ F の条件で electroporation を行った。10 分間静置した後、200ml の 10% FCS- α -MEM 核酸 (-) 培地に懸濁した。10 枚の 96 穴プレートに 200 μ l/穴ずつ播き、培養した。

5-2 遺伝子導入された細胞の選択

96 穴プレート培養において細胞の生育が見られた穴の抗体発現量を hIgG ELISA で比較した。hIgG 発現量が高かった 10 穴ずつ 70 穴の細胞を 12 穴プレートに植え継ぎ、10% FCS- α -MEM 核酸 (-) 培地で培養した。細胞が 10% FCS- α -MEM 核酸 (-) 培地に馴化し、良好な生育が見られた段階で、抗ヒト TF 抗体変異体の発現量を hIgG ELISA で測定した。各変異体について 4 穴ずつ選択し、50ml フラスコに植え継いだ。10nM MTX を含む 10% FCS- α -MEM 核酸 (-) 培地に交換し、抗体産生量を増幅させた。

5-3 無血清培地を用いた大量培養による抗ヒト TF 抗体変異体の産生

抗ヒト TF 抗体変異体クローンの中から hIgG 発現量の高いものを 1 クローンずつ選択し、10nM MTX を含む培地を用いて 6 本の 175cm² フラスコで培養した。サ

- 43 -

ブコンフルエントになったところで、150ml の CHO-S-SFM II 無血清培地に交換し、7 日間培養した。培養上清を回収し、0.22 μ m フィルターで培地を処理した後、精製まで -80°C で保存した。

5-4 サンドイッチ ELISA による抗ヒト TF 抗体変異体の発現量の測定

抗ヒト IgG(γ)抗体を 96 穴プレートに 100 μ l/穴ずつ分注し、 4°C で一晩放置した。RB で 3 回洗浄した後、DB を 200 μ l/穴ずつ分注し、室温で 2 時間放置してブロッキングした。DB を除去した後、DB もしくは抗ヒト TF 抗体変異体産生細胞から抗体を回収する際に用いた培地にて適当に希釈したサンプルおよびスタンダードを 100 μ l/穴ずつ加え、室温で 2 時間放置した。RB で 3 回洗浄した後、DB にて 10,000 倍希釈した HRP 標識化抗ヒト IgG 抗体を 100 μ l/穴ずつ分注し、室温で 1 時間放置した。RB で 10 回洗浄した後、発色試薬を 100 μ l/穴ずつ分注し、室温で約 10 分間放置した。2N 硫酸を 50 μ l/穴ずつ添加して発色反応を停止した後、マイクロプレートリーダーにより測定波長 450nm、対照波長 655nm で吸光度を測定した。

この結果、Gly55Gly 以外の変異体については、数 mg ずつの抗ヒト TF 抗体変異体を得ることができた（表 6）。

表 6

バージョン	G55G	G55F	G55L	G55E	G55K	G55I	99D01
クローン No.	196	41	96	23	237	127	
α -MEM N(-)(ng/mL)	29	64	9	59	600	110	
α -MEM 10nM MTX(ng/mL)	50	836	3451	6143	423	369	
CHO-SFM-II (大量培養 : 900mL) (μ g/mL)	0.24	15.4	41.7	50	11.5	5.8	
精製(バッファ交換後 : μ g/mL, 全 7mL)	-	319	379	624	180	153 (4mL)	1556

6. 抗ヒト TF 抗体各変異体の精製

各変異体の含まれた大量培養上清から、HiTrap rProtein A FF カラムと HiTra

- 4 4 -

p Q Sepharose HP カラムを用いて各変異体を精製した。

6-1 精製用アフィニティクロマトグラフィー

以下の条件で低温室にてアフィニティクロマトグラフィーを行った。

システム : FPLC System

カラム : HiTrap rProtein A FF (1.6cm ϕ ×2.5cm、5ml)

平衡化緩衝液 : D-PBS (－)

洗浄用緩衝液 : 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)

溶出用緩衝液 : 50mM 酢酸 (pH 2～3)

サンプルは、0.5M リン酸 2 ナトリウム溶液で pH を 7.4 に調整した後、カラムに添加した。抗ヒト TF 抗体原体は 1.5ml (16.5mg) を 50ml の洗浄用緩衝液で希釈した。流速 5ml/分、25ml (5C.V.) の溶出用緩衝液で溶出し、1.25ml の 1M Tris base を添加して pH 6～7 に中和した。

6-2 精製用陰イオン交換クロマトグラフィー

次に、以下の条件で低温室にて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。

システム : FPLC System

カラム : HiTrap Q Sepharose HP (0.7cm ϕ ×2.5cm、1ml)

緩衝液 A : 50mM Tris-HCl (pH 8.0、4℃)

緩衝液 B : 50mM Tris-HCl (pH 8.0、4℃) / 1M NaCl

アフィニティクロマトグラフィーによる Protein A 溶出画分に 1.25ml の 1M Tris base を添加し、pH 8～9 に調整して、サンプルを調製した。流速 1ml/分にて 0mM NaCl (5C.V.)、250mM NaCl (5+5C.V.)、1M NaCl (10C.V.) のステップ溶出を行い、250mM NaCl ステップの前半 5C.V. (5ml) を回収した。

Gly55Gly 以外の抗ヒト TF 抗体変異体については、それぞれ 500 μ g 以上得ることができた (表 5)。Gly55Gly が得られなかったことから、抗ヒト TF 抗体と比較するために、代わりに抗ヒト TF 抗体 bulk (Lot No.99D01) を同様の操作で精製して用いることにした (表 5)。

- 4 5 -

7. 分析用陰イオン交換クロマトグラフィー

以下の条件で室温にて陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、サンプルを分析した。

システム : SMART System

カラム : MonoQ PC1.6/5 (0.16cm ϕ ×5cm、0.1ml)

緩衝液 A : 50mM Tris-HCl (pH 8.0、20°C)

緩衝液 B : 50mM Tris-HCl (pH 8.0、20°C) / 500mM NaCl

流速 50 μ l/分にて、0%B/5 分、0~60%B/30 分、60~100%B/10 分、100%B/10 分のグラジエントプログラムでグラジエント溶出した。サンプルは UV 換算で 2 μ g を緩衝液 A で 50 μ l に 3~50 倍希釈し、うち 25 μ l を分析に供した。

精製した抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) と抗ヒト TF 抗体各変異体を分析用陰イオン交換クロマトグラフィーで分析した結果、導入したアミノ酸変異に依存した溶出時間の変化は見られるものの、ほぼ単一ピークであることが確認された (図 12)。

8. アミノ酸変異による抗ヒト TF 抗体の脱アミド化抑制

脱アミド化反応を見るために、脱アミド化しやすい中性領域での緩衝液を用いて、加熱条件下で加速試験を行った。

8-1 緩衝液置換

20mM リン酸ナトリウム緩衝液/150mM 塩化ナトリウム (pH7.5) を緩衝液として使用し、PD-10 脱塩カラムでサンプルの緩衝液置換を行った。カラムを平衡化した後、2.5ml のサンプルを 2 本のカラムに添加し、3.5ml の緩衝液で溶出した。

8-2 加速試験用サンプル調製

hIgG ELISA による定量値を基に、抗ヒト TF 抗体各変異体サンプルを 100 μ g/ml となるように希釈した。緩衝液には 20mM リン酸ナトリウム緩衝液/150mM NaCl (pH 7.5) を用いた。0.22 μ m フィルターを通し、1ml ずつ 5ml バイアルに充填

- 4 6 -

した。

8-3 加速試験

精製した抗ヒト TF 抗体 bulk (99D01) と抗ヒト TF 抗体変異体について、20mM リン酸ナトリウム緩衝液／150mM NaCl (pH 7.5) 溶液中で、40℃にて 4 週間加速試験を行った。0、1、2、4 週間の各ポイントでサンプルを取り出し、活性については TF 結合活性、TF 中和活性の比較をそれぞれ行い、脱アミド化については分析用陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分析した。

活性の比較には、GPC のモノマー画分を指標として再度定量した値 (表 7) を用いた。すなわち、以下の条件で室温にて抗体の定量を行った。

システム : Waters (600S Controller、616 Pump、486 Tunable absorbance detector、717 plus Autosampler)

カラム : TSK gel G3000SWXL (0.78cm ϕ \times 30cm、ガードカラム 0.6cm ϕ \times 4cm)

緩衝液 : 50mM リン酸ナトリウム／300mM NaCl (pH 7.0)

100 μ l (10 μ g 相当量) の加速品をサンプルに用いて、流速 0.5ml/分で分析した。

表 7

	初期値	1 週	2 週	4 週
99D01	116.1	115.2	116.5	112.4
G55L	116.5	113.8	115.6	113.7
G55I	102.7	99.6	98.4	94.5
G55F	118.3	115.3	114.8	111.8
G55E	110.8	110.2	110.7	109.8
G55K	135.2	134.9	136.0	130.9

この結果、加速試験前の TF 結合活性は、抗ヒト TF 抗体変異体を一過性発現さ

- 47 -

せたときと同様に、Gly55Ile が抗ヒト TF 抗体 bulk (Lot No.00C01) の 26% 程度と低く、99D01 に比べると著しく活性が損なわれていた (図 1 3 A)。Gly55Leu、Gly55Glu、Gly55Phe、Gly55Lys については、99D01 とほぼ同等の活性を保持していた (図 1 3 A)。4 週間の加速試験後、99D01 では加速試験前の約 60% に活性が低下しているのに対して、抗ヒト TF 抗体変異体は加速試験前の 80% 以上の活性を維持していた (図 1 3 B)。

分析用陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて脱アミド化を分析すると、99D01 では脱アミド化された分子種と考えられるピークが明らかに増大していたが、抗ヒト TF 抗体変異体ではほとんど観察されなかった (図 1 4)。経時的な TF 中和活性の変化では、99D01 が比較的大きな活性低下を示した (図 1 5)。

これらの結果より、Gly55 の置換により Asn55 の脱アミド化が抑制されており、アミノ酸置換は特に Gly55Leu および Gly55Phe が好ましいと考えられた。

9. 加速実験前後の TF 中和活性

99D01 および抗ヒト TF 抗体各変異体の TF 中和活性を図 1 6 に示す。Gly55Glu と Gly55Ile はそれぞれ 41%、13% 程度と低い活性を示したが、他の 3 種類の抗ヒト TF 抗体変異体については 56~74% であり、99D01 (66%) と同程度の活性を保持していた。

99D01 および抗ヒト TF 抗体各変異体の加速試験による経時的な活性低下の変化量を検討するために、図 1 5 から各サンプルの IC₅₀ 値の対初期値を算出した (図 1 7)。なお、Gly55Ile の 40°C-4 週間加速試験後サンプルに関しては、IC₅₀ 値を算出できなかったため、2 週間目までの結果を示した。40°C-4 週間加速試験後には、99D01 の TF 中和活性は初期値の約 40% にまで低下していた。これに対して、Gly55 を他のアミノ酸に置換した各変異体については、40°C-4 週間加速試験後でも初期値の 50~70% の TF 中和活性を維持していた。

以上の結果から、抗体中のアスパラギンに隣接するグリシンを他のアミノ酸に置換しても抗体の活性は低下せず、なおかつ脱アミド化による不安定化を抑制で

- 48 -

きることが見出された。

産業上の利用の可能性

本発明者らは、アスパラギンに隣接するグリシンを他のアミノ酸に置換すれば、抗体の活性に影響を与えないことを見出した。本発明を抗体に対して適用することにより、活性低下の少ない抗体を製造することができ、長時間にわたる安定性が求められる医学的製剤等においても使用できる抗体が得られる。また、本発明は、抗体以外のタンパク質に対しても適用することが可能であり、これによりタンパク質の活性に影響を与えずに、脱アミド化を抑制しうるものと考えられる。

請求の範囲

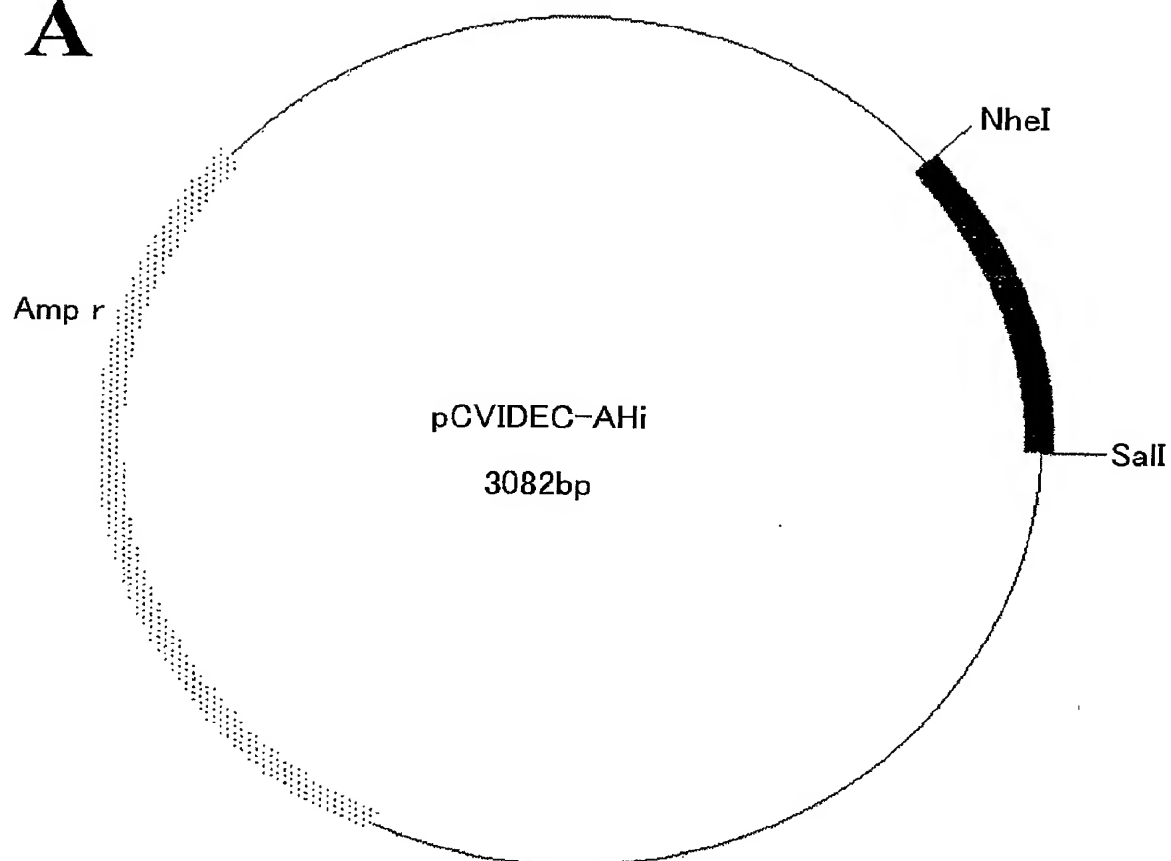
1. タンパク質中の脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸で置換することを特徴とするタンパク質の安定化方法。
2. 脱アミド化されるアミノ酸がアスパラギンである、請求項 1 に記載のタンパク質の安定化方法。
3. 脱アミド化されるアミノ酸の C 末端側に隣接するアミノ酸がグリシンである、請求項 1 に記載のタンパク質の安定化方法。
4. タンパク質が抗体である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質の安定化方法。
5. 抗体がヒト型化抗体である、請求項 4 に記載のタンパク質の安定化方法。
6. 脱アミド化されるアミノ酸が相補性決定領域 (CDR) に存在することを特徴とする、請求項 4 または 5 に記載のタンパク質の安定化方法。
7. 相補性決定領域 (CDR) が CDR2 である請求項 6 に記載のタンパク質の安定化方法。
8. タンパク質が抗原結合タンパク質である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質の安定化方法。
9. タンパク質が免疫グロブリンスーパーファミリーである、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質の安定化方法。
10. タンパク質が医薬品である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質安定化方法。
11. 請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法により安定化されたタンパク質。
12. 抗原結合活性がアミノ酸置換前の抗原結合活性の 70% 以上であることを特徴とする、請求項 11 に記載の安定化されたタンパク質。

1

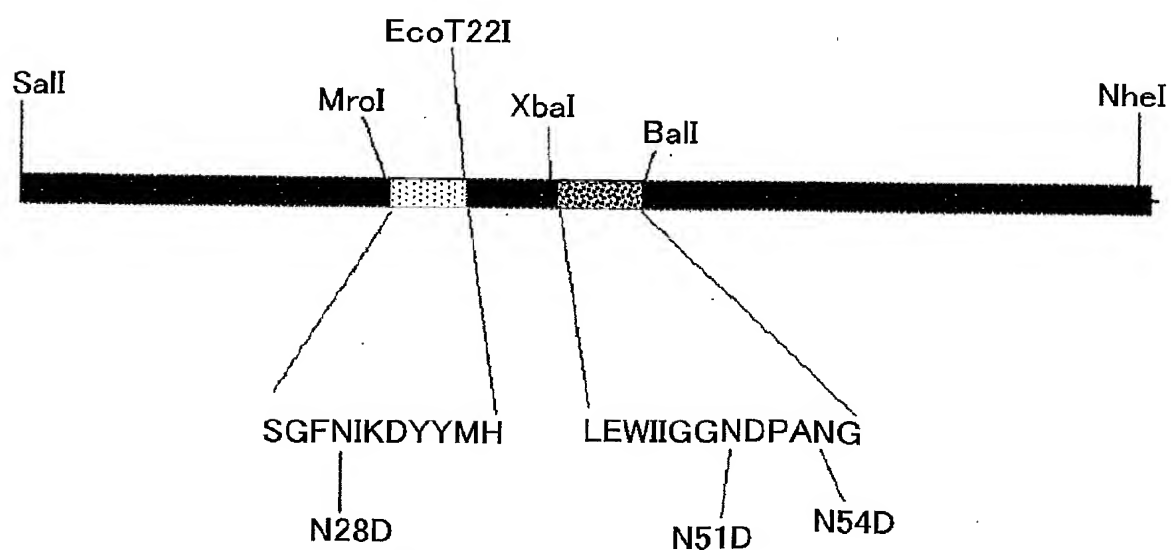
重鎖				
QVQLLESGAVLARPGTSVKISKASGFNIK	DYYMH	WVKQRPQGGLLEWIG	GNDPANNGHSMYDPKFQG	
FR1	CDR1	FR2	CDR2	
RVTITADTSTSTVFMELSSLRSEDTAVYYCAR	DSGYAMDY	WGQGTLLVTVSS		
FR3	CDR3	FR4		
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTK				
VDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS				
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTTSKAKGQPREPQVYVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP				
PVLDSGDGSFFLYSRLLTVDKSRWQEAGNPFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLK				
輕鎖				
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIKSFLSWYQQKPEKAPKSLIYYATSLADGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGES				
PYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY				
EKHKVYACEVTHQCLSSPVTKSFNRGEC				

2 / 17

図 2

A**B**

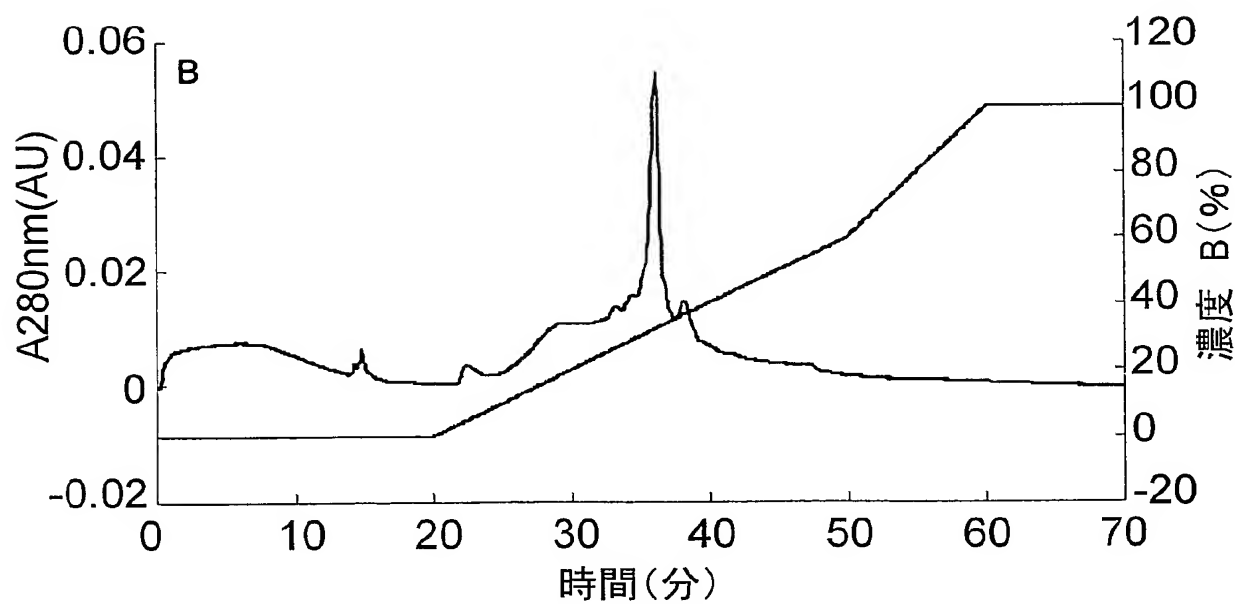
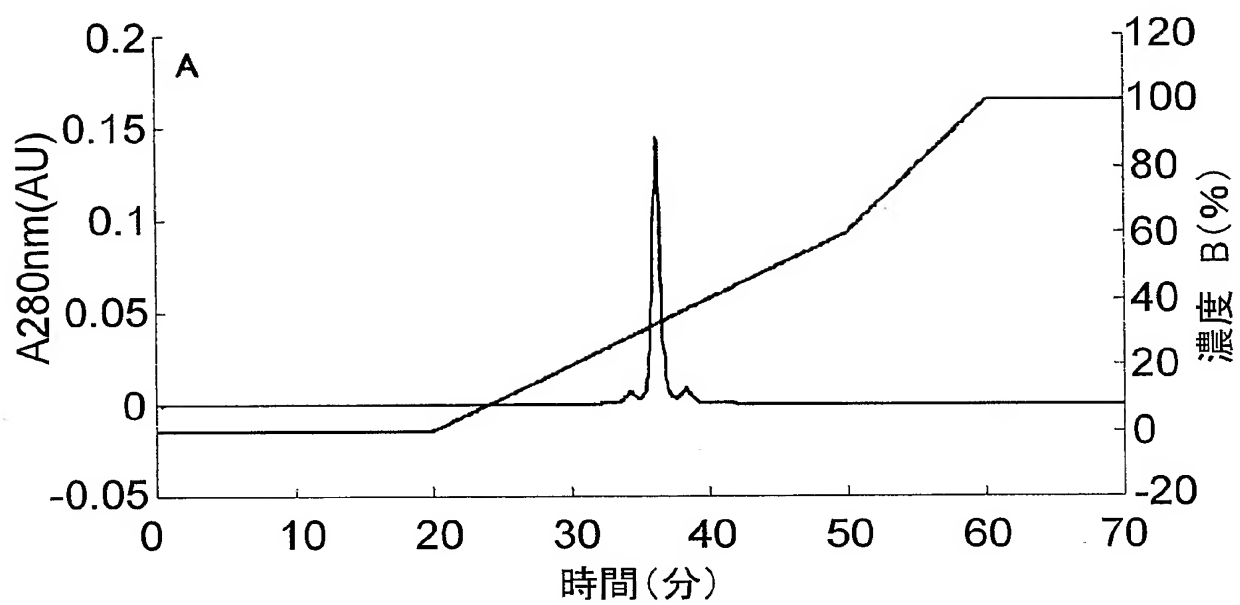
抗ヒトTF抗体重鎖可変領域 (425bp)



差 替 え 用 紙 (規則26)

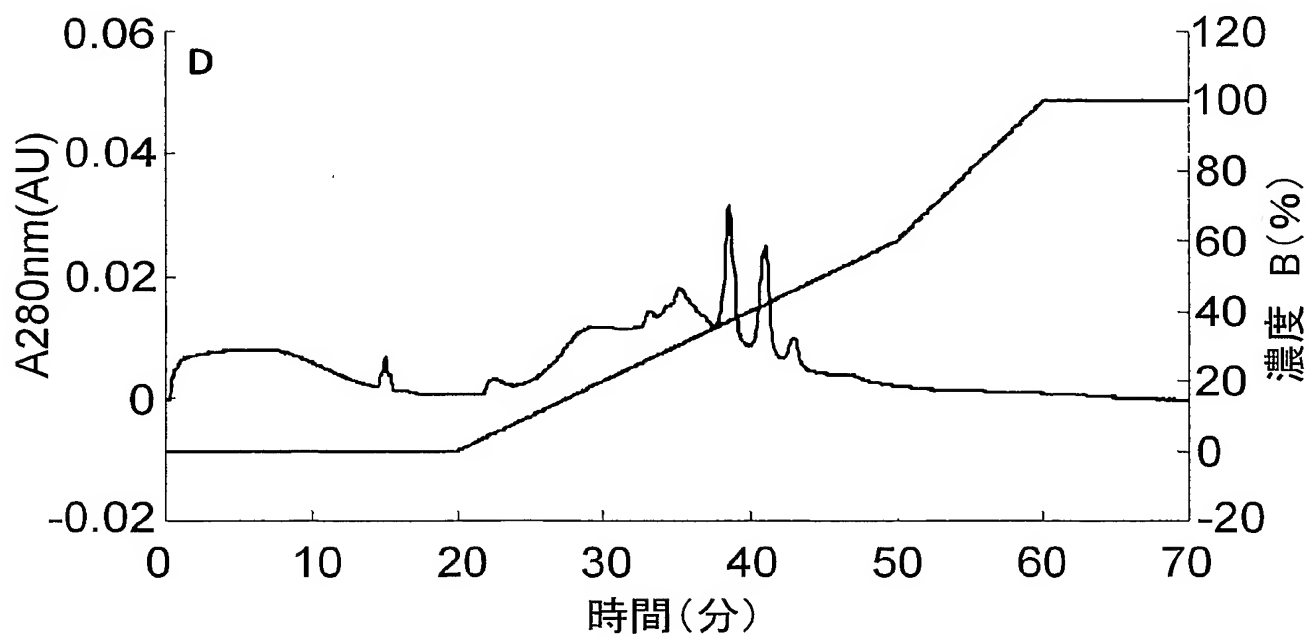
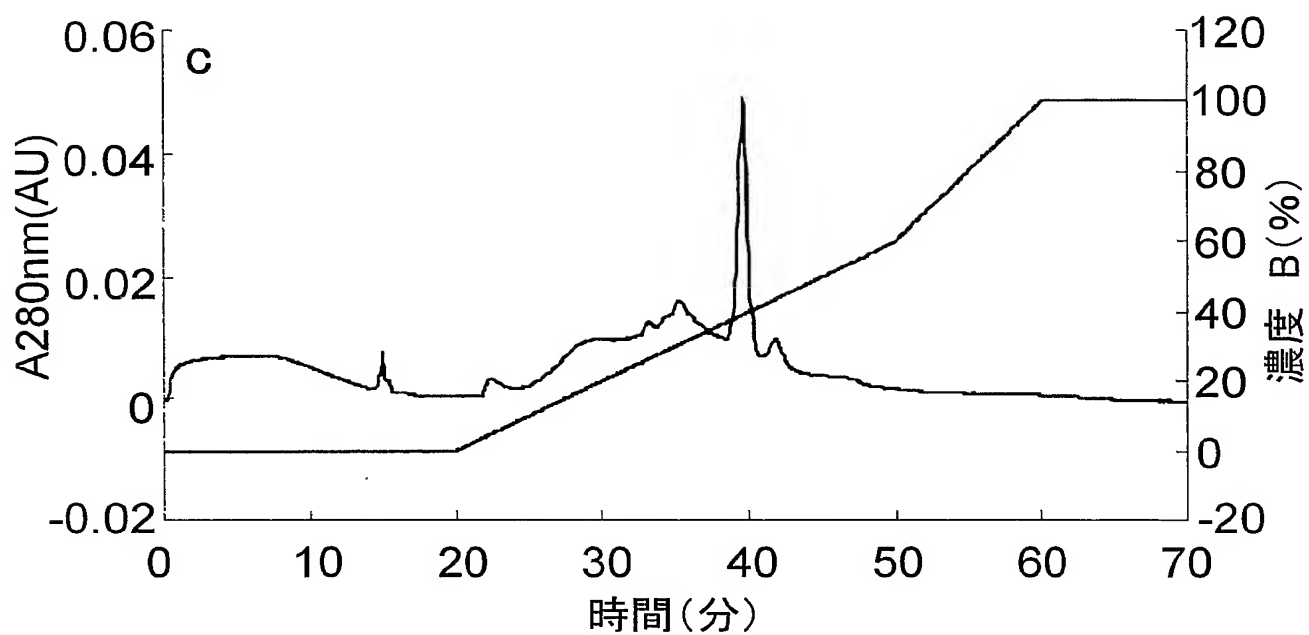
3 / 17

図 3



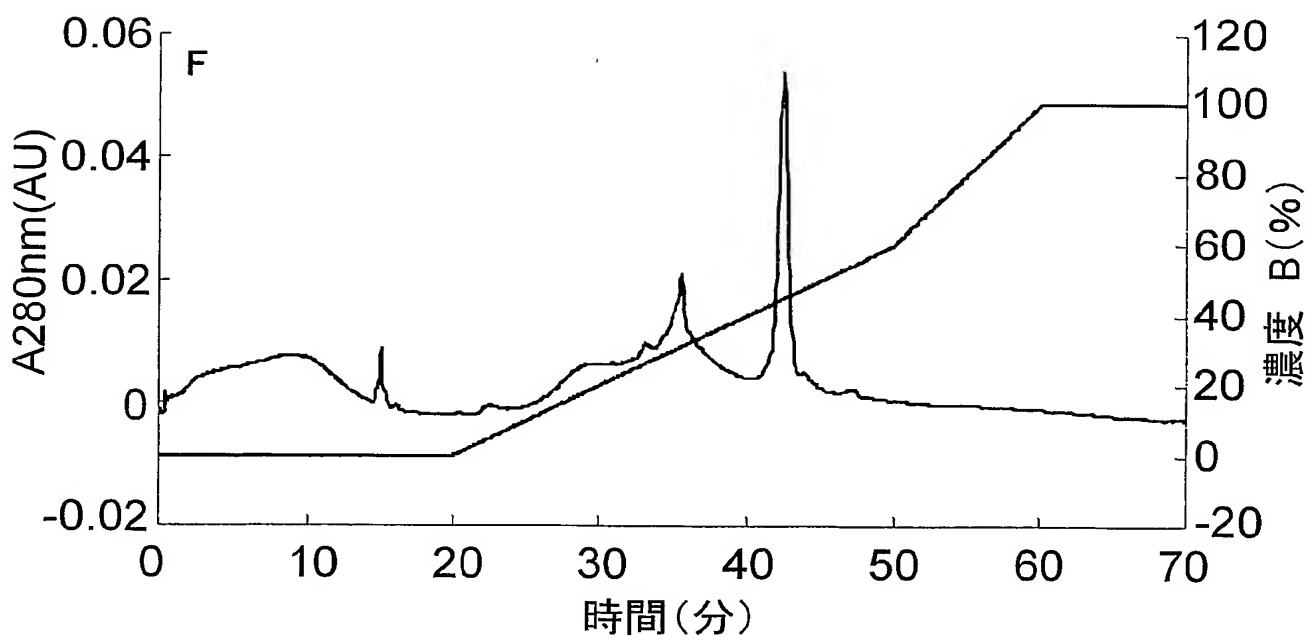
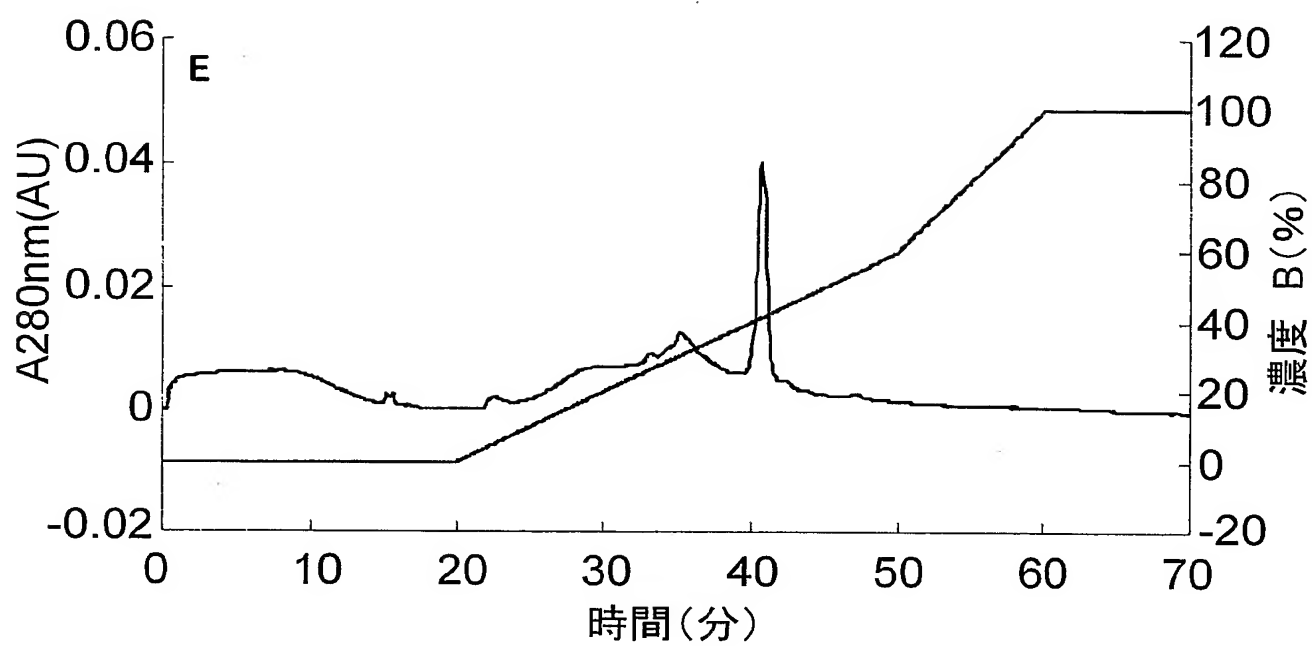
4 / 17

図4



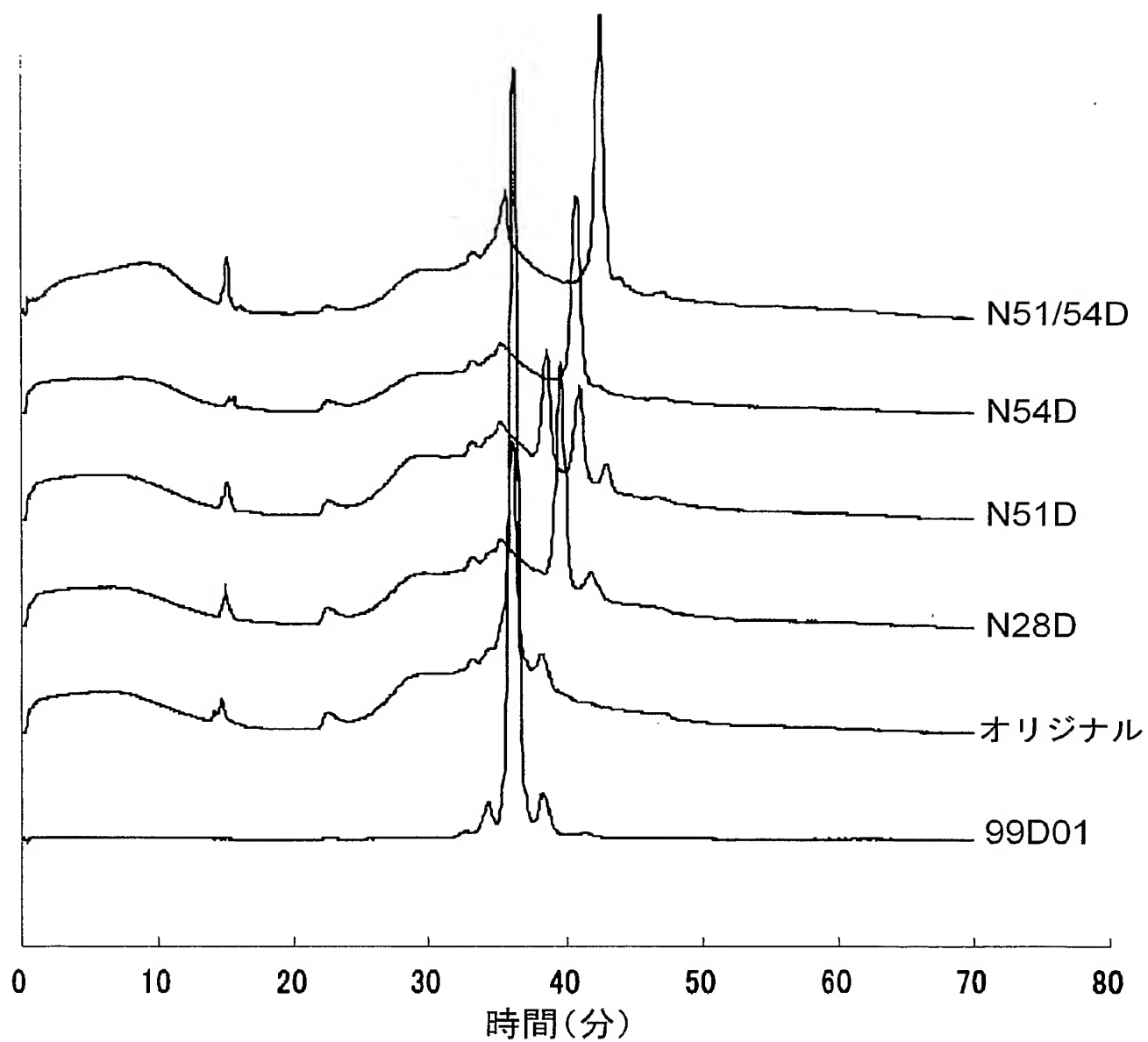
5 / 17

図 5



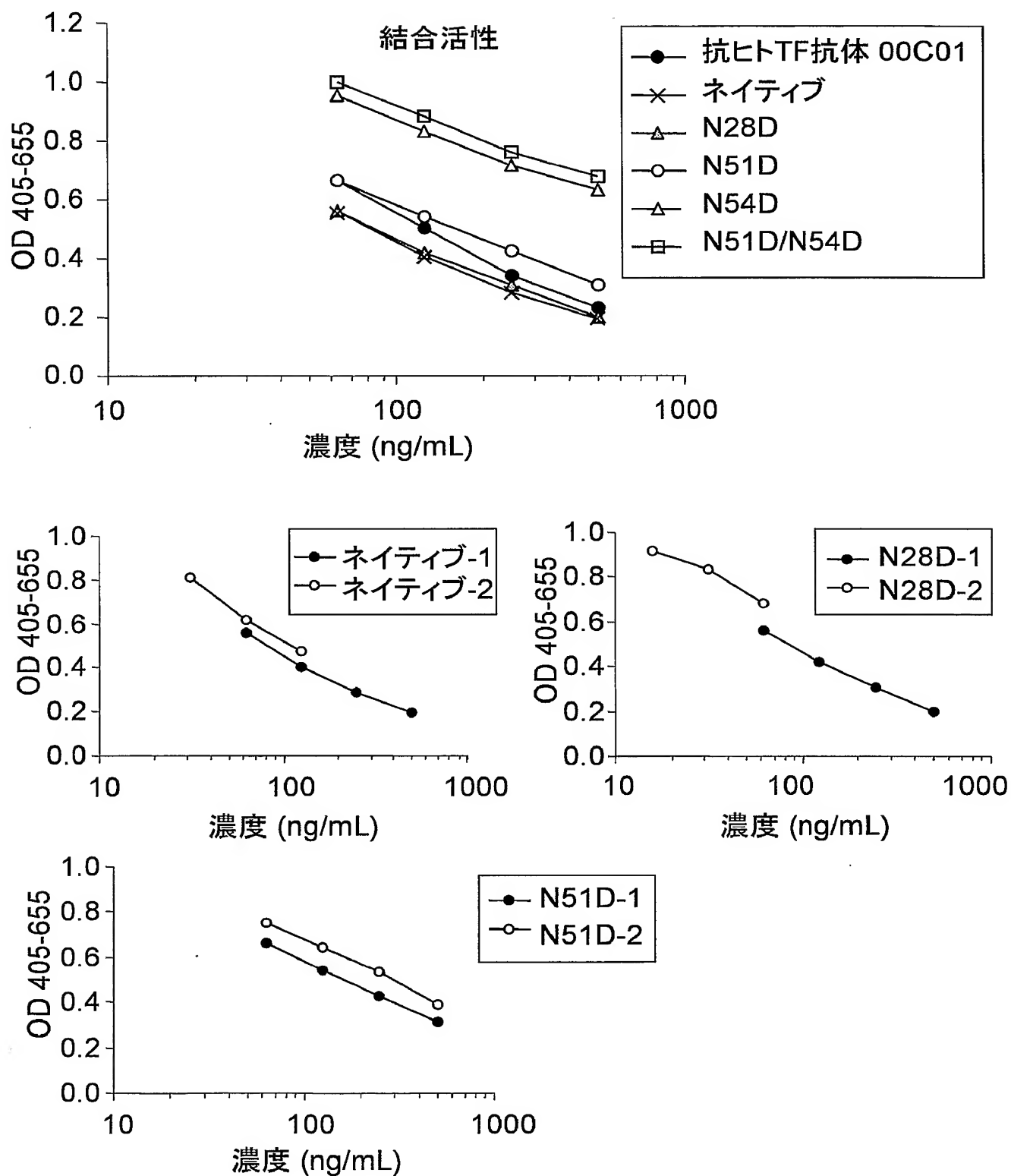
6 / 17

図 6



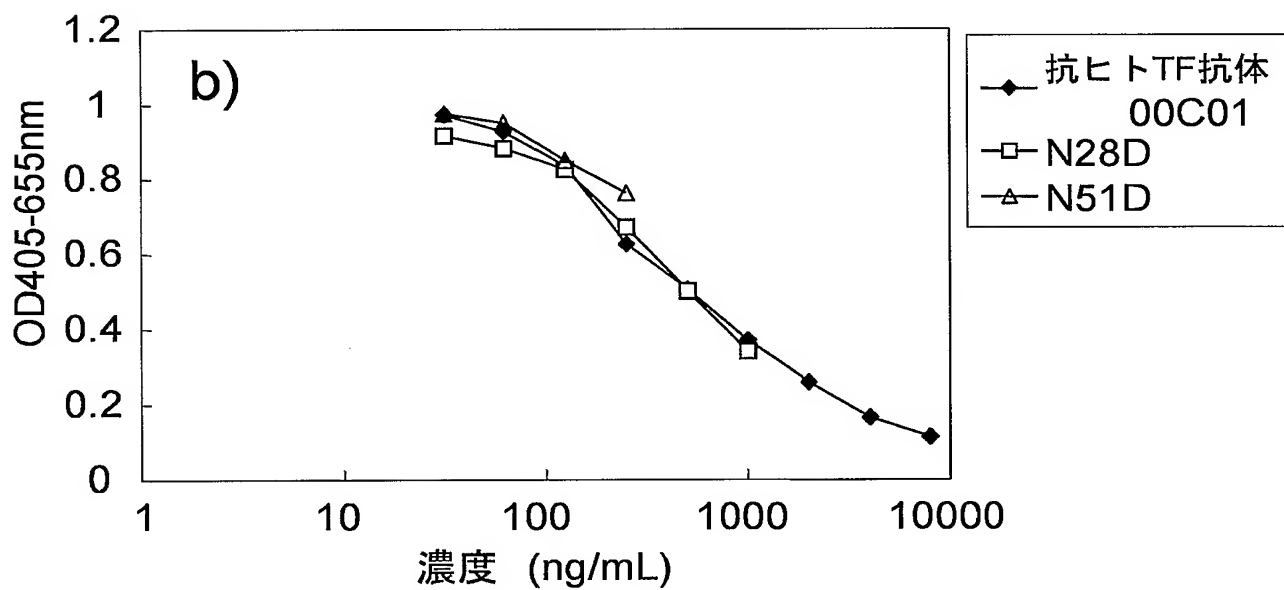
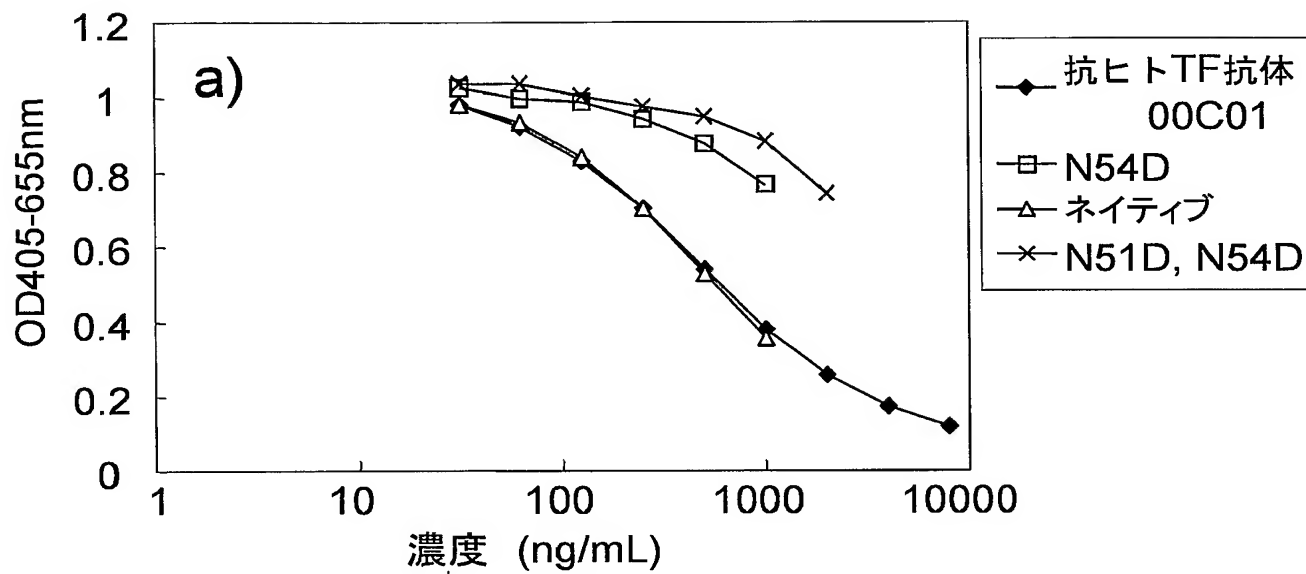
7 / 17

図 7



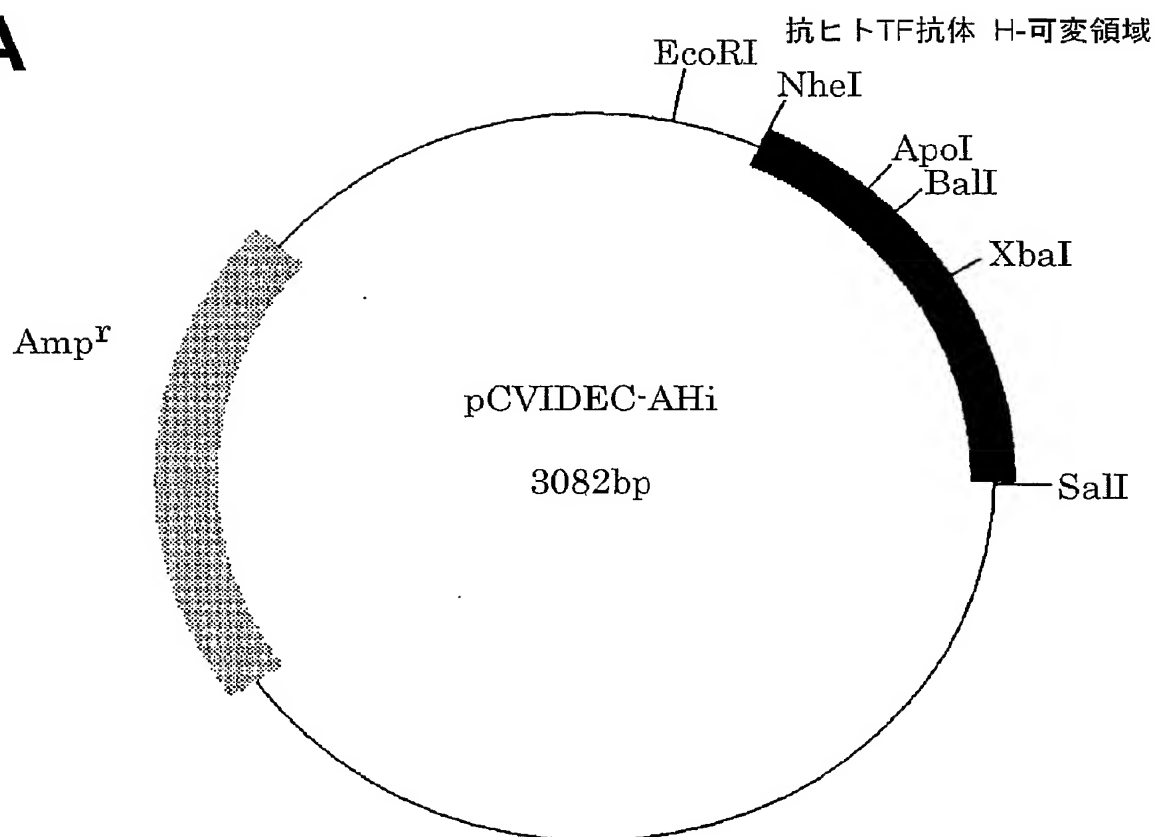
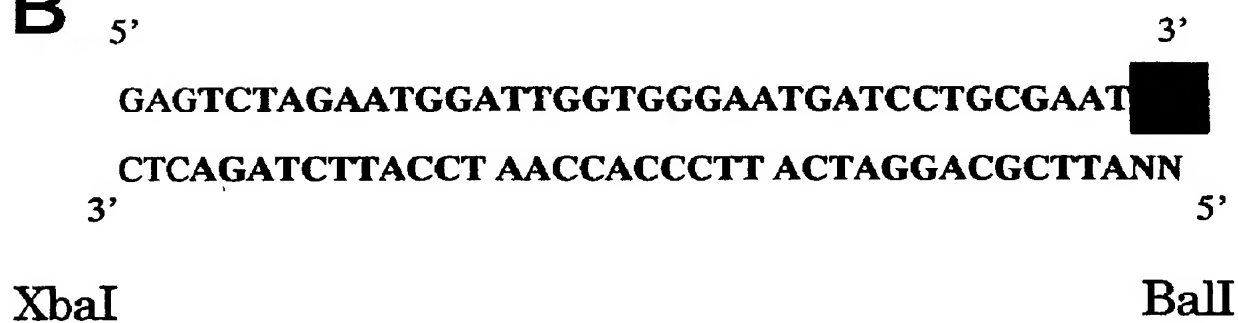
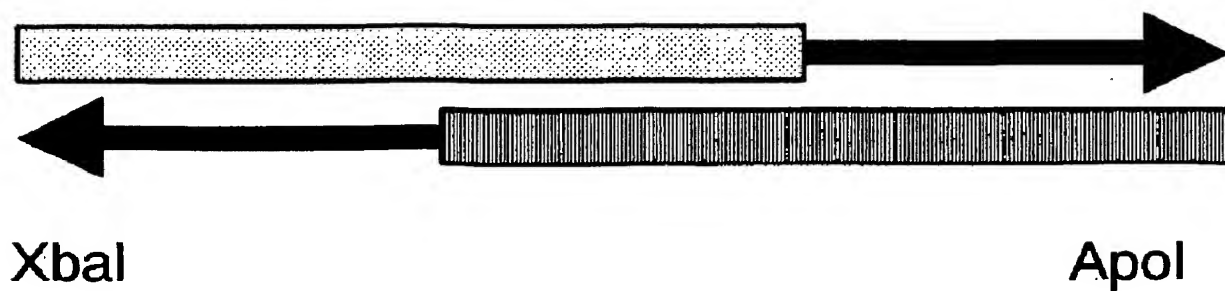
8 / 17

図 8



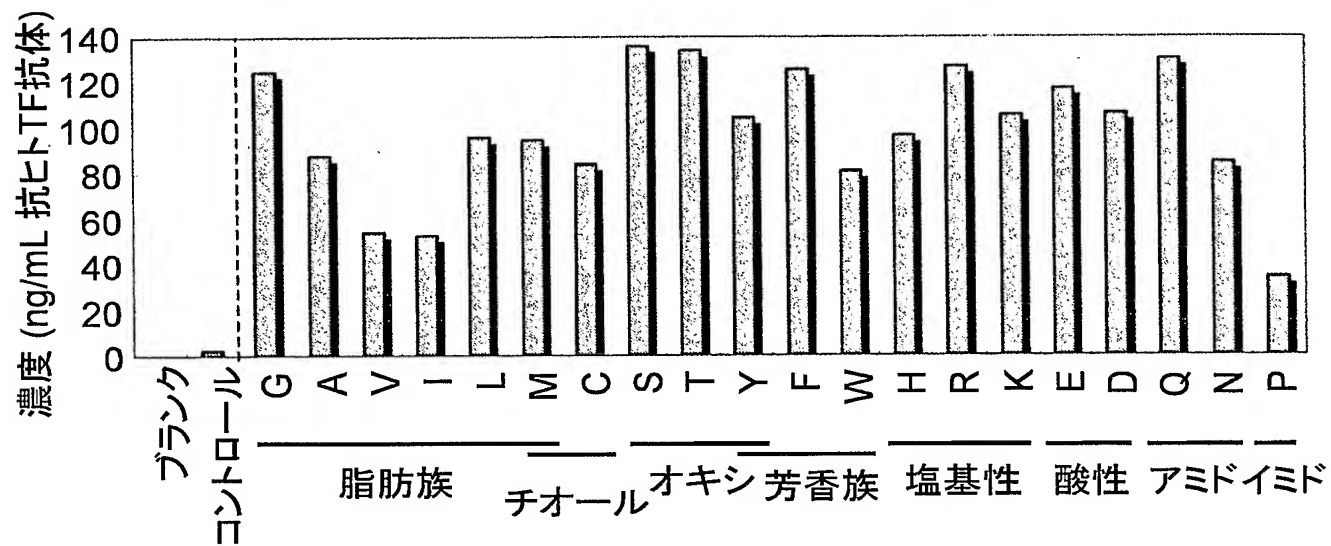
9 / 17

図 9

A**B****C**

10/17

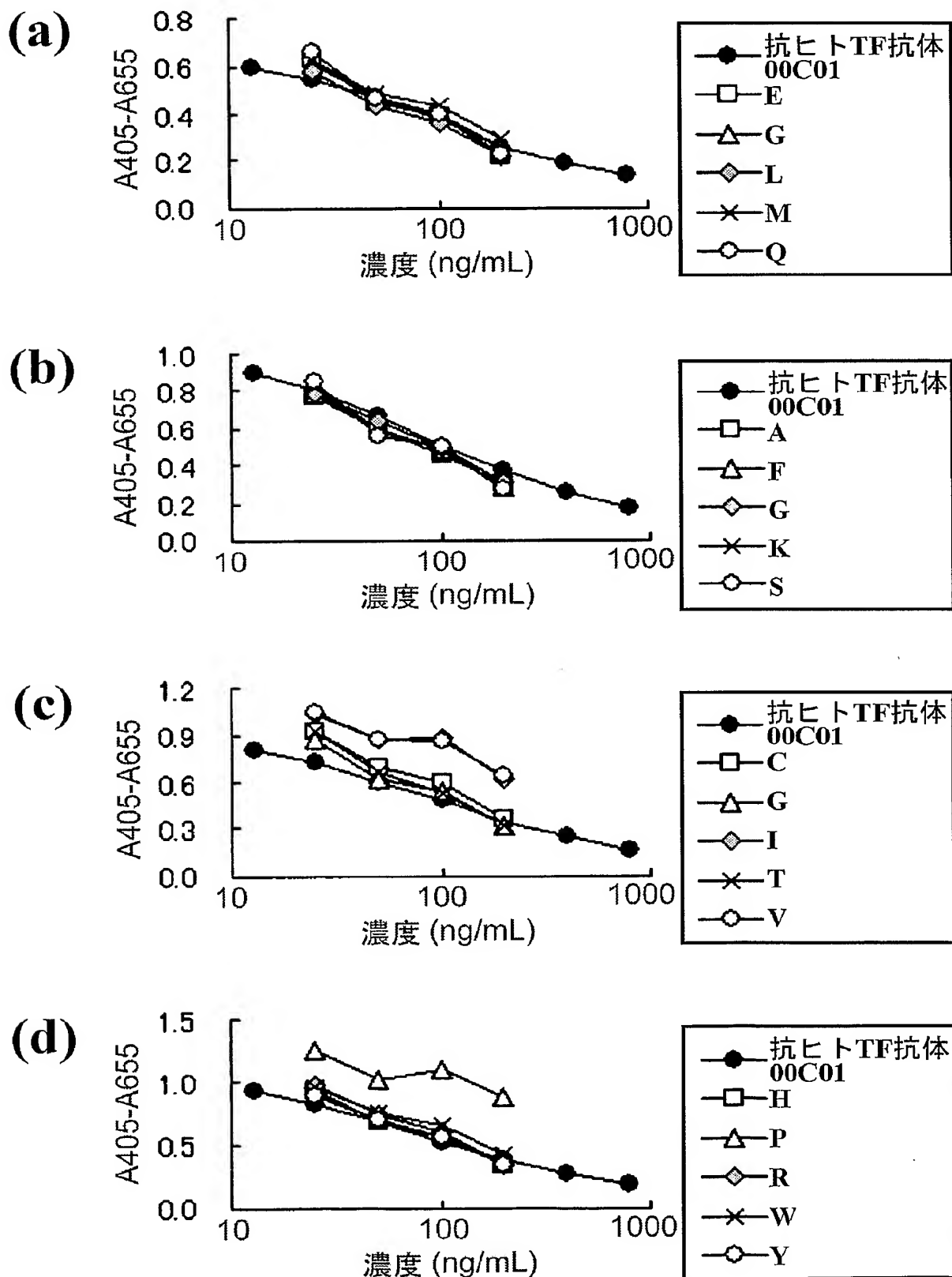
図 10



サンプル : 100ng/mL

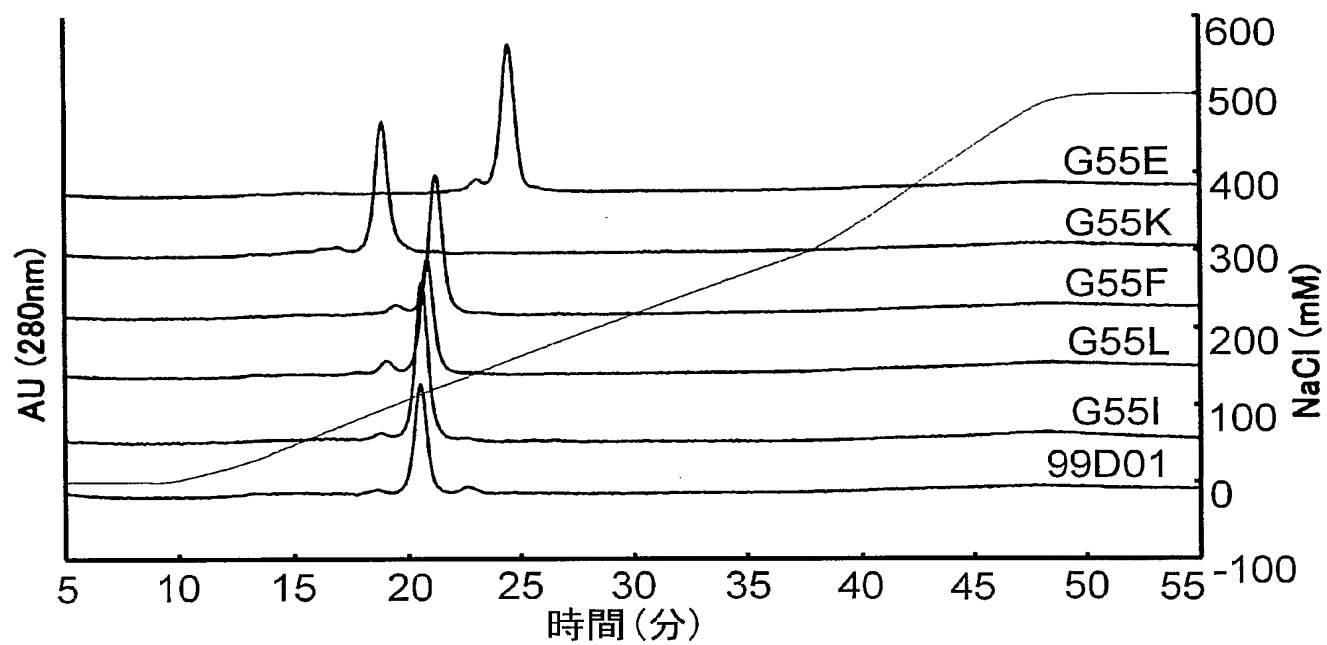
11 / 17

図 1 1



12/17

図 12



13 / 17

図 13

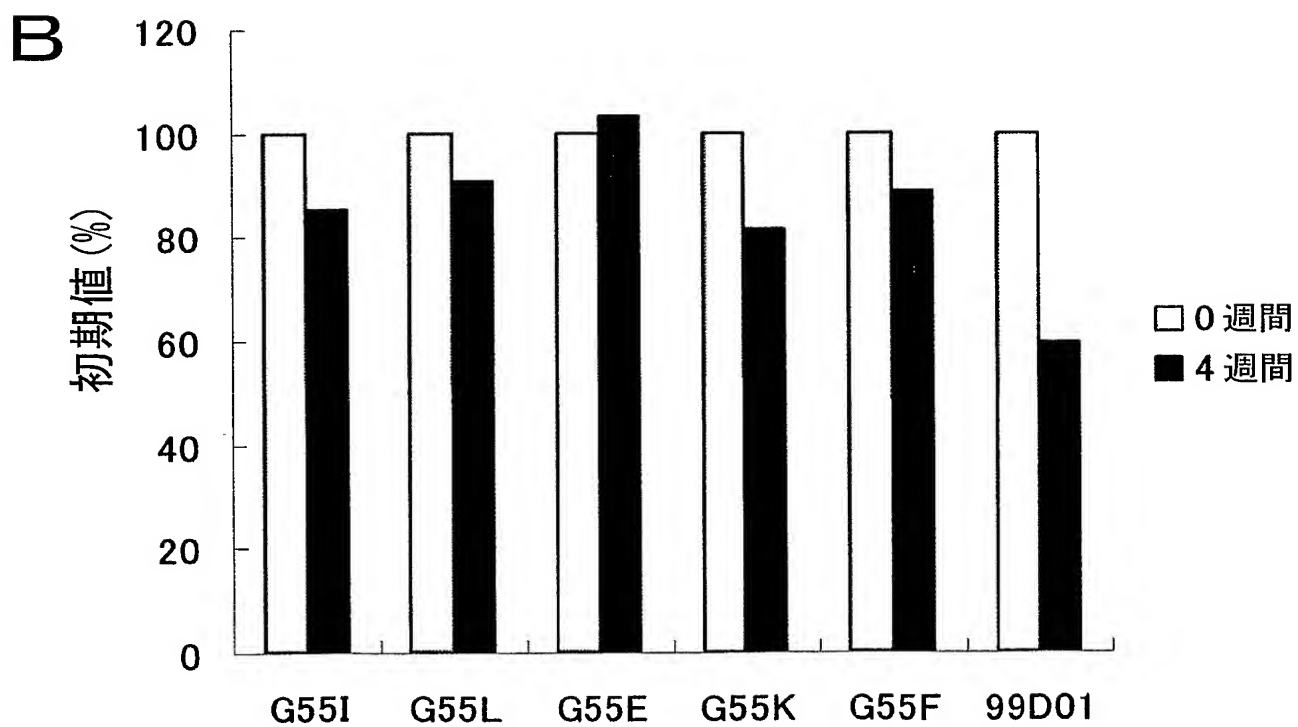
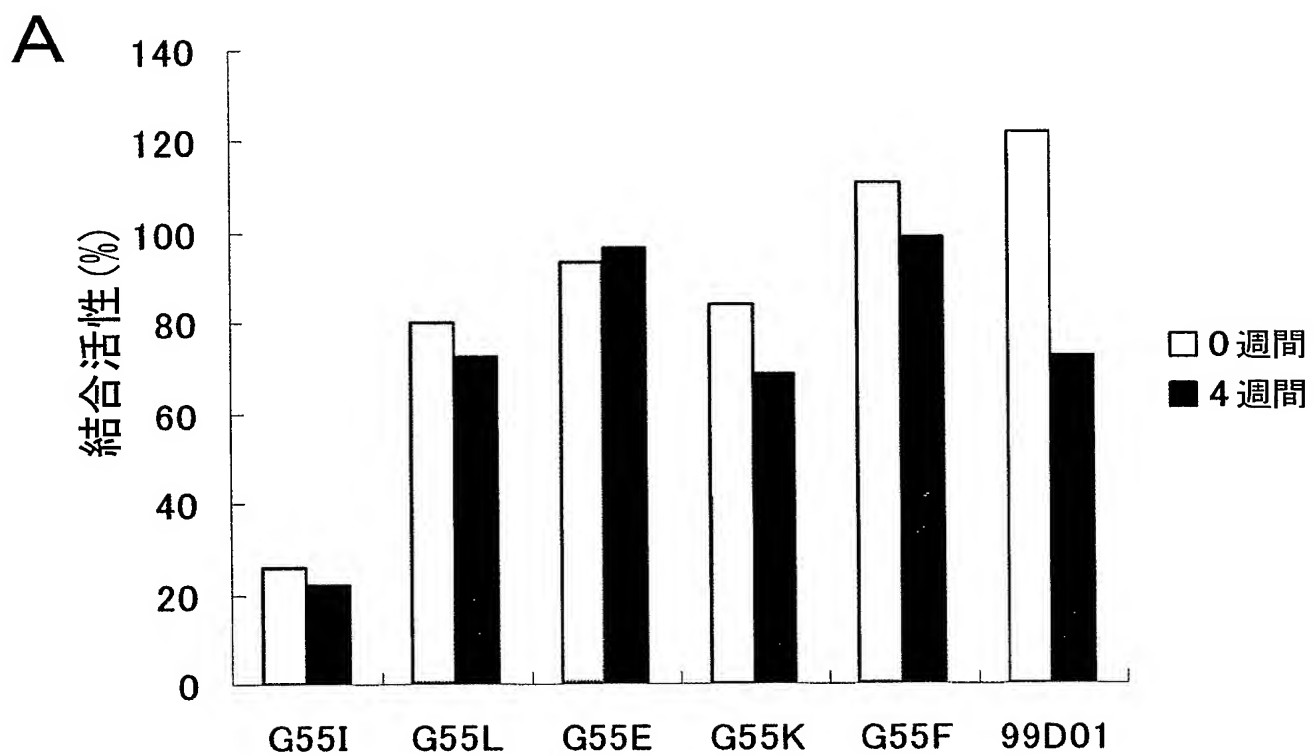
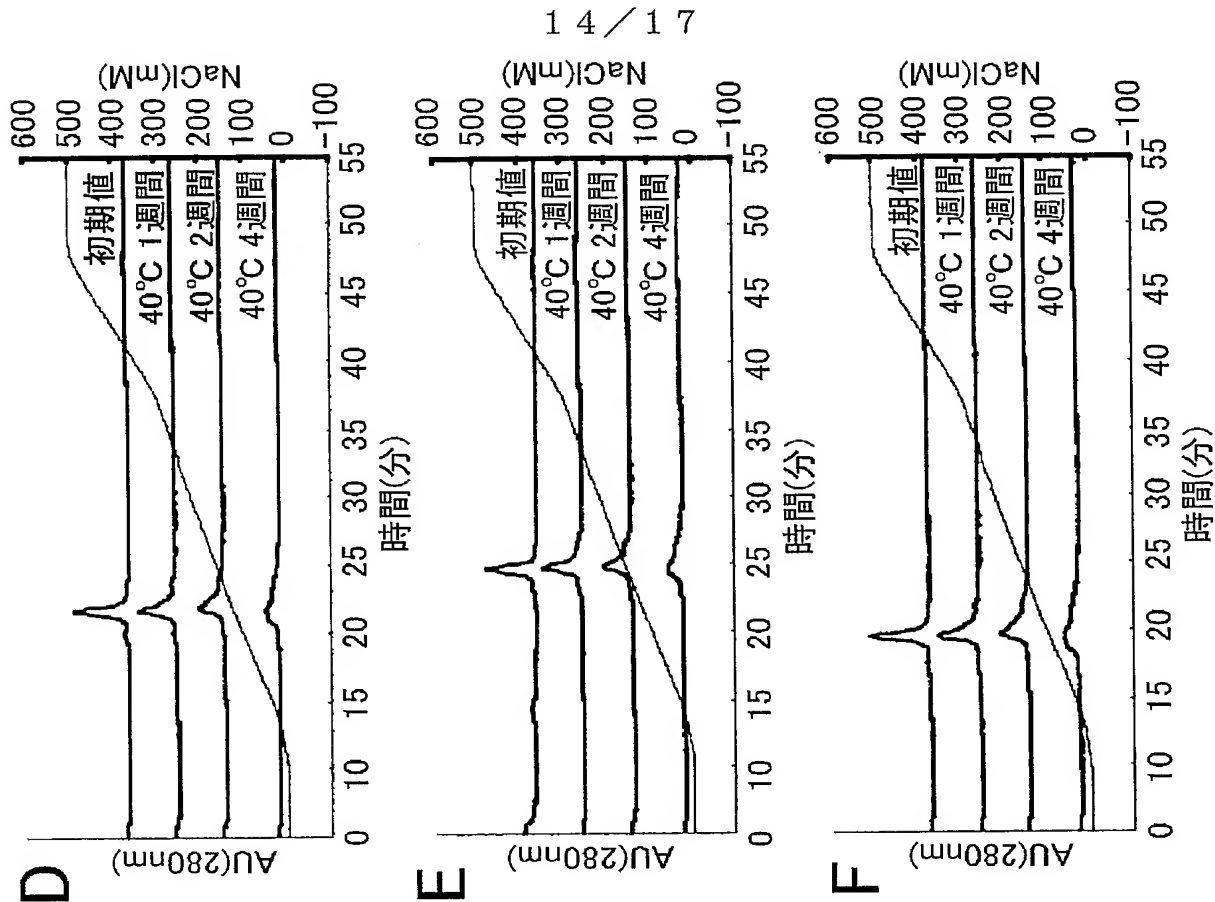
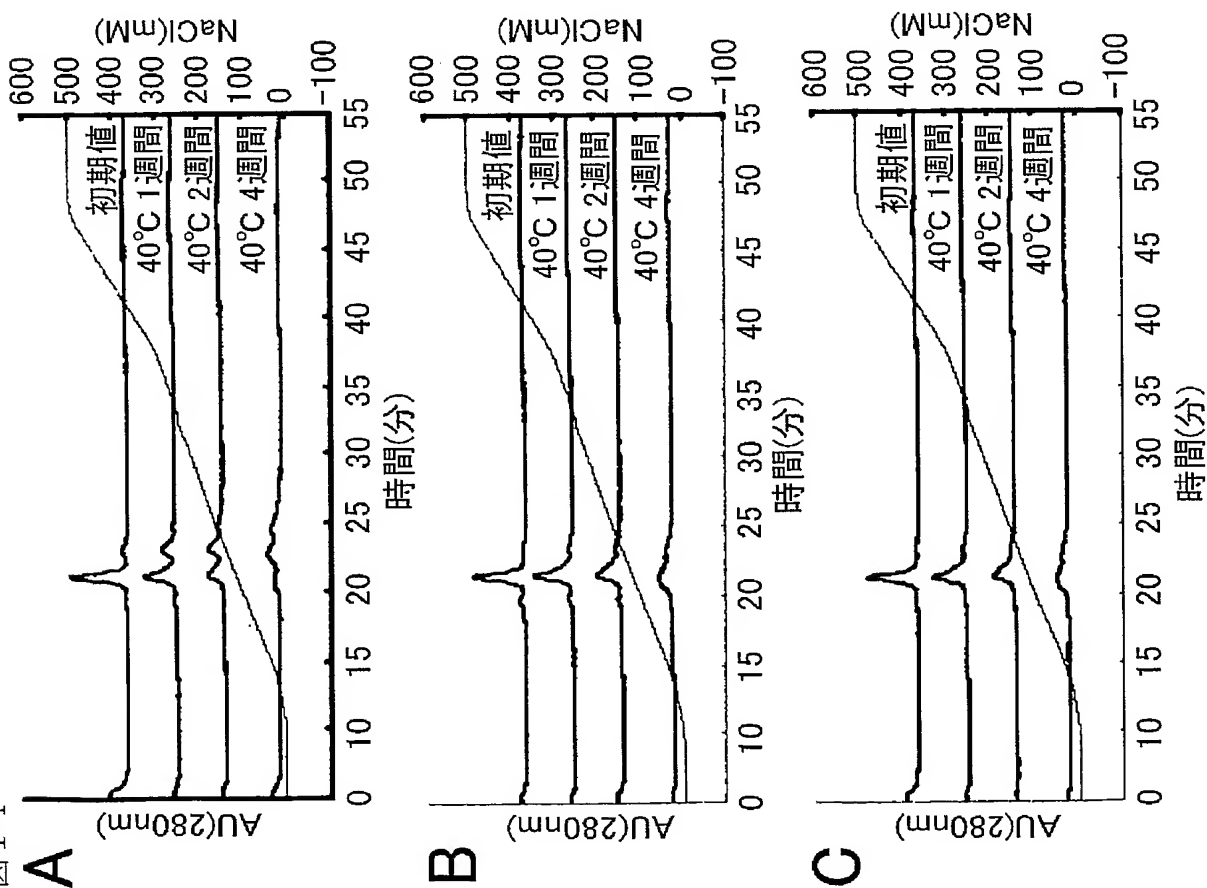


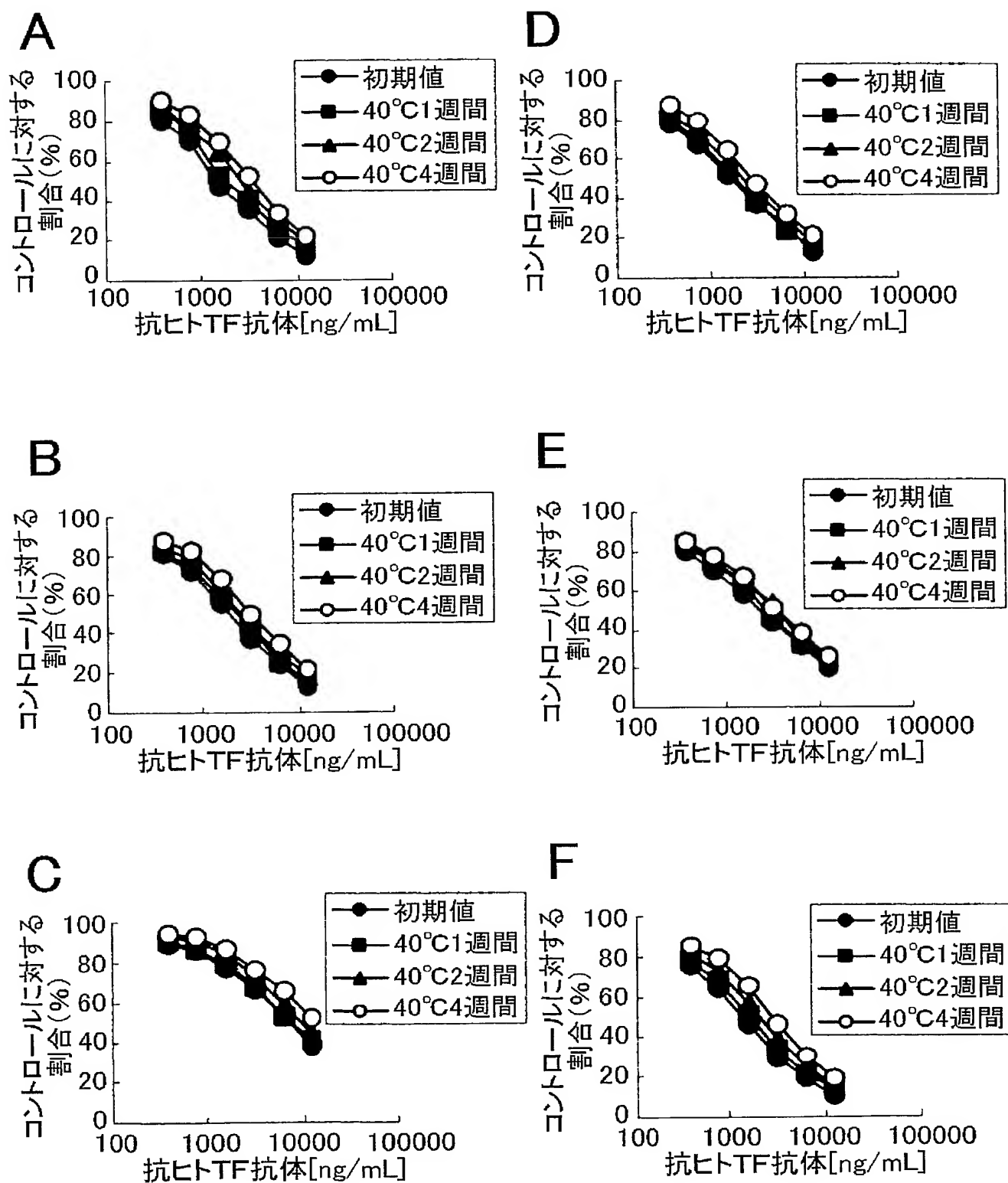
図 14



14 / 17

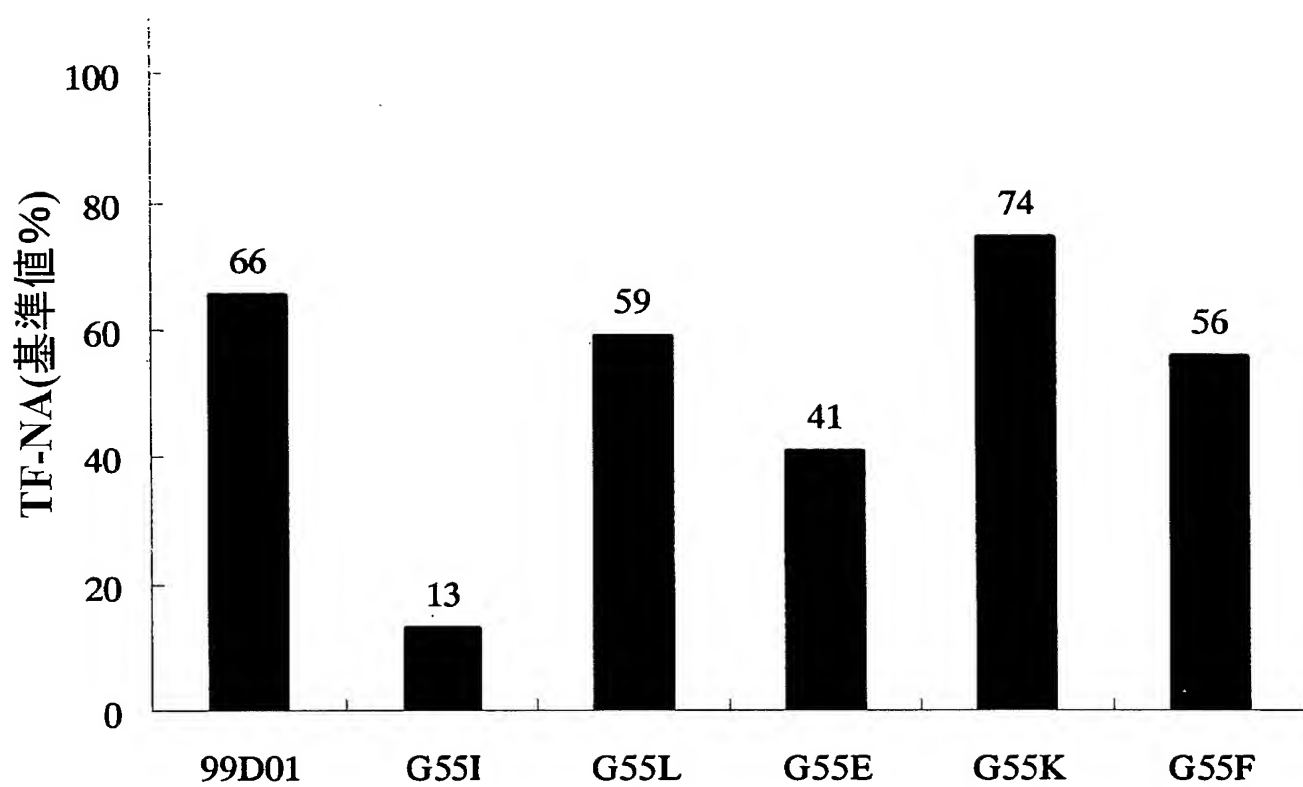
15 / 17

図15



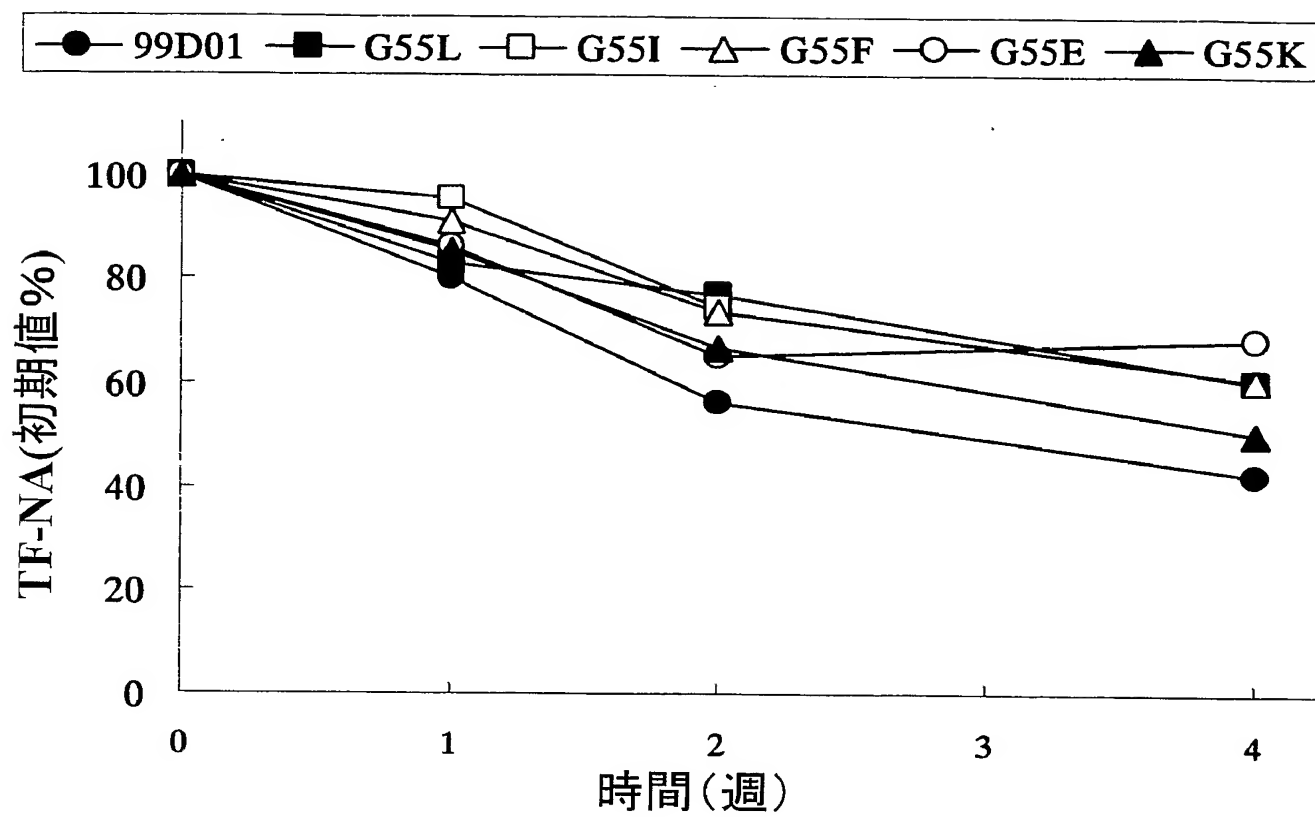
16 / 17

図 16



17 / 17

図 17



1 / 2 0

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> The method of protein stabilization

<130> C1-A0112P

<140>

<141>

<150> JP 2001-400895

<151> 2001-12-28

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

2 / 20

<400> 1

aattggaagc ttgc

14

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

ccttcgaacg ttaa

14

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

3 / 2 0

<400> 3

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaatatg c

41

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

gagaatttcg ggtcatacat actatgcata ttgcaggat

40

<210> 5

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

4 / 2 0

<400> 5

gagtctagaa tggattgggtg ggaatgatcc tgcgaataag cat

43

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

gagaatttgc ggtcatacat actatgctta ttcgcaggat

40

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

5 / 2 0

<400> 7

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaattgg cat

43

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

gagaatttcg ggtcatacat actatgccaa ttcgcaggat

40

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

6 / 2 0

<400> 9

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgccaatcag cat

43

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

gagaatttcg ggtcatacat actatgctga ttgcgaggat

40

<210> 11

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

7 / 20

<400> 11

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaatgag cat

43

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

gagaatttcg ggtcatacat actatgctca ttcgcaggat

40

<210> 13

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

8 / 2 0

<400> 13

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaatttc cat

43

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

gagaatttgc ggtcatacat actatggaaa ttcgcaggat

40

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

9 / 20

<400> 15

gagtctagaa tggattgggtg ggaatgatcc tgccaatacc cat

43

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

gagaatttcg ggtcatacat actatgggta ttcgcaggat

40

<210> 17

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

1 0 / 2 0

<400> 17

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaataac cat

43

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

gagaatttcg ggtcatacat actatggtta ttcgcaggat

40

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

1 1 / 2 0

<400> 19

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaaatgac cat

43

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

gagaatttcg ggtcatacat actatggtca ttcgcaggat

40

<210> 21

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

1 2 / 2 0

<400> 21

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgccaatccc cat

43

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

gagaatttcg ggtcatacat actatgggga ttgcaggat

40

<210> 23

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

1 3 / 2 0

<400> 23

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgccaattgc cat

43

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

gagaatttcg ggtcatacat actatggcaa ttgcaggat

40

<210> 25

<211> 444

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

1 4 / 2 0

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20

25

30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp Pro Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Phe

65

70

75

80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

115

120

125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

130

135

140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

1 5 / 2 0

145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

1 6 / 2 0

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290

295

300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305

310

315

320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

325

330

335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln

340

345

350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355

360

365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370

375

380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385

390

395

400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

405

410

415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

420

425

430

17 / 20

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

440

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Ser Phe

20

25

30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

1 8 / 2 0

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100

105

110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145

150

155

160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165

170

175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

1 9 / 2 0

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized sequence

<400> 27

gagtctagaa tggattggtg ggaatgatcc tgcgaat

37

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized sequence

<220>

<221> misc_feature

2 0 / 2 0

<222> (1)..(2)

<223> n = g, a, c, or t

<400> 28

nnattcgcag gatcattccc accaatccat tctagactc

39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/13804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K1/00, 16/36, C12P21/08, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K1/00-19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	BLANCHE F. et al., Stabilization of Recombinant Adenovirus: Site-Directed Mutagenesis of Key Asparagine Residues in the Hexon Protein. Anal. Biochem. 2001, Vol.297, No.1, pages 1 to 9	<u>1-12</u> <u>4-12</u>
<u>X</u> <u>Y</u>	TOMIZAWA H. et al., Stabilization of lysozyme against irreversible inactivation by alterations of the Asp-Gly sequences. Protein Eng. 1995, Vol.8, No.10, pages 1023 to 1028	<u>1-12</u> <u>4-12</u>
Y	EP 1069185 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 17 January, 2001 (17.01.01), & WO 99/51743 A1	4-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 January, 2003 (24.01.03)

Date of mailing of the international search report
12 February, 2003 (12.02.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, C07K 1/00, 16/36, C12P 21/08, A61K 39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90, C07K 1/00-19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	BLANCHE F. et al. Stabilization of Recombinant Adenovirus: Site-Directed Mutagenesis of Key Asparagine Residues in the Hexon Protein. Anal. Biochem. 2001, Vol. 297, No. 1, p. 1-9	<u>1-12</u> 4-12
<u>X</u> Y	TOMIZAWA H. et al. Stabilization of lysozyme against irreversible inactivation by alterations of the Asp-Gly sequences. Protein Eng. 1995, Vol. 8, No. 10, p. 1023-1028	<u>1-12</u> 4-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 01. 03

国際調査報告の発送日

12.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 1069185 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2001.01.17 & WO 99/51743 A1	4-12